



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de la capacidad emulsificante de cepas
nativas de *Pseudomonas* spp. productoras de
ramnolipidos aisladas de ambientes contaminados con
petróleo**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Nora Pamela PACHECO DE LA CRUZ

ASESOR

Dra. Susana Mónica GUTIÉRREZ MORENO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pacheco, N. (2019). *Evaluación de la capacidad emulsificante de cepas nativas de Pseudomonas spp. productoras de ramnolipidos aisladas de ambientes contaminados con petróleo*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional)

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0002-7885-7384

DNI del autor:

47178005

Grupo de investigación:

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

FINCyT, Contrato N° 238-FINCyT-IA-2013.

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas:

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos,
Coordenadas: 12° 3' 30" S, 77° 5' 0" W

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2015-2016



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

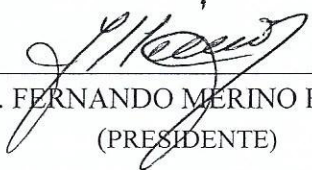
Siendo las 16:00 horas del 20 de agosto de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **NORA PAMELA PACHECO DE LA CRUZ**.

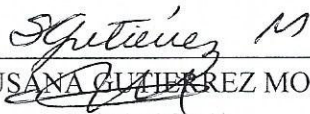
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 022-EPMP-2019, el titulado expuso su tesis: **“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE DE CEPAS NATIVAS DE *Pseudomonas spp.* PRODUCTORAS DE RAMNOLÍPIDOS AISLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS CON PETRÓLEO”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19....., calificativo: Aprobada con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **NORA PAMELA PACHECO DE LA CRUZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 20 de agosto de 2019.


Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(PRESIDENTE)


Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO
(ASESORA)


Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(MIEMBRO)


Blgo. AUGUSTO DE LA CRUZ CALVO
(MIEMBRO)

A mis padres y hermanas.

AGRADECIMIENTOS

En esta investigación quisiera en primer lugar agradecer infinitamente a mis padres, Rocío y Polo, quienes con todo su esfuerzo, amor y dedicación me han permitido lograr alcanzar esta meta, quiero agradecerles por siempre brindarme su apoyo, y principalmente porque nunca me faltó su cariño, estaré eternamente agradecida.

A mis hermanas, Sannie, Andrea, Alessandra y Adriana, quienes me han brindado su apoyo incondicional en todo momento, me han impulsado a ser mejor cada día, por ser mi fortaleza, mi mejor ejemplo y mi motivación porque también quiero ser un buen ejemplo para ellas.

A mis profesores Susana Gutiérrez y Fernando Merino, quienes son mis segundos padres, por sus enseñanzas, por impulsarme a continuar, por sus consejos, no tengo palabras para agradecerles todo su apoyo.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que me acogió como una hija, a la facultad de Ciencias biológicas y todo el equipo que labora en la facultad, a cada uno de los profesores quienes me dieron todos los conocimientos para poder desenvolverme en el campo profesional y laboral.

Al laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana, a todos los integrantes que pasaron por el laboratorio, quienes me apoyaron en la parte experimental de la tesis, me enseñaron, me motivaron, me aconsejaron y me dieron su ejemplo. A Paul, Yesenia, Cinthya, Diandra, Takeshi, Manuel, Elim, Guillermo, Carmen, Jaime, Kim, María Gracia, Gustavo, Kevin, Ingrid, Jakeline, Vivian. A mis amigos y familiares de quienes siempre recibí los mejores consejos, gracias por su apoyo, y gracias a cada una de las personas quienes de forma directa o indirecta me apoyaron para lograr alcanzar esta meta.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Contaminación ambiental.....	3
2.1.1. Contaminación por hidrocarburos	3
2.1.2. Contaminación por hidrocarburos en el Perú.....	4
2.2. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos	5
2.2.1. Biorremediación.....	5
2.3. Emulsión.....	8
2.3.1. Regla de Bancroft	9
2.4. Los surfactantes	10
2.4.1. Propiedades de los surfactantes	11
2.4.1.1. Concentración micelar critica (CMC).....	11
2.4.1.2. Numero de agregación (n_a)	12
2.4.1.3. Escala HLB.....	13
2.4.1.4. Punto de nube.....	13
2.4.2. Tipos de surfactantes	13
2.4.3. Aplicación de los surfactantes.....	13
2.4.4. Los biosurfactantes	14

2.4.4.1. Ramnolípidos (RL)	15
2.4.4.2. Los biosurfactantes en el incremento de la biodisponibilidad	16
2.4.4.3. Aplicación de surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	17
2.4.4.4. Selección de microorganismos productores de biosurfactantes	19
III. HIPOTESIS.....	21
3.1. Variables de la investigación	21
3.1.1. Variable independiente.....	21
3.1.2. Variable dependiente.....	21
IV. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Material Biológico	23
5.2. Reactivación de cepas	23
5.3. Actividad emulsificante	23
5.3.1. Preparación de la emulsión.....	24
5.4. Índice de emulsificación (E24)	24
5.5. Análisis de datos.....	25
VI. RESULTADOS	26
6.1. Actividad emulsificante	26
6.2. Índice de emulsión	30
6.3. Comparación entre capacidad de producción de RL y actividad emulsificante	35
6.3.1. Prueba de normalidad de variables	35
6.3.1.1. Prueba de normalidad para variable actividad emulsificante	35
6.4. Coeficiente de correlación	37

6.4.1. Coeficiente de correlación entre la actividad emulsificante y la producción de Ramnolípidos.....	37
6.4.2. Coeficiente de correlación entre el índice de emulsión y la producción de Ramnolípidos.....	40
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
7.1. Actividad emulsificante.....	43
7.2. Índice de emulsión	45
7.3. Correlación	46
7.3.1. Correlación entre actividad emulsificante y el área de halo H5 de precipitación de RL.....	47
7.3.2. Correlación entre índice de emulsión y el área de halo H5 de precipitación de RL	49
VIII. CONCLUSIONES	51
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52
X. ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de un surfactante.	10
Figura 2. Tipos de micelas (Farn, 2008).....	11
Figura 3. Representación de los surfactantes al llegar a la concentración micelar crítica (CMC) (Jiménez <i>et al.</i> , 2010)	12
Figura 4. Esquematzación de la medición de la emulsión para obtener el índice de emulsión.....	25
Figura 5. Valores de Actividad Emulsificante en UAE/ml de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> , ordenadas de menor a mayor (Tabla 9).....	27
Figura 6. Rangos de valores de actividad emulsificante y la cantidad de cepas que obtuvieron valores dentro de cada rango.	28
Figura 7. Diagrama de caja y bigotes de la actividad emulsificante de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> evaluadas.	29
Figura 8. Índice de emulsión expresado en porcentaje de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> ordenadas de menor a mayor (Tabla 10).	32
Figura 9. Rangos de índice de emulsión de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> , evaluadas.	33
Figura 10. Diagrama de caja y bigotes para el índice de emulsión de las 157 cepas de <i>Pseudomonas sp.</i> evaluadas.	34
Figura 11. Grafica de dispersión entre las variables Actividad Emulsificante y Área de halo H5 de precipitación de RL.....	38
Figura 12. Grafica de dispersión entre las variables actividad emulsificante y área de halo H5 de precipitación de RL que indica el código de cada cepa.	39
Figura 13. Gráfica de dispersión entre las variables índice de emisión y área de halo H5 de precipitación de RL.....	41
Figura 14. Gráfica de dispersión entre las variables índice de emulsión y área de halo H5 de producción de RL con sus respectivos códigos.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticos de Actividad emulsificante (UAE/ml) de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> Evaluadas.....	26
Tabla 2. Relación de cepas con valores atípicos de actividad emulsificante donde se indica también su área de halo H5 de producción de RL.	30
Tabla 3. Estadísticos del Índice de emulsión (%) de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp.</i>	31
Tabla 4. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable Actividad Emulsificante (UAE/ml)	35
Tabla 5. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable Índice de Emulsión (%)	36
Tabla 6. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable área de halo H5 de RL	37
Tabla 7. Prueba de coeficiente de correlación Rho de Spearman entre las variables Actividad emulsificante y área de halo H5 de precipitación de RL.....	38
Tabla 8. Evaluación del coeficiente de correlación Rho de Spearman entre las variables índice de emulsión y área de halo H5 de producción de RL.....	40
Tabla 9. Datos de Actividad Emulsificante de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp</i> evaluadas.	59
Tabla 10. Datos de Índice de Emulsión de las 157 cepas de <i>Pseudomonas spp</i> evaluadas.	63

RESUMEN

Los derrames de hidrocarburos de petróleo son considerados como uno de los principales contaminantes de suelos y cuerpos de agua, provocando modificaciones en los ecosistemas, alterando su estructura y sus bioprocesos. Frente al problema de contaminación que produce la industria petrolera, una solución efectiva que se plantea es la biorremediación usando microorganismos degradadores de petróleo. Algunas especies del género *Pseudomonas spp.* producen biosurfactantes que incrementan la biodisponibilidad del petróleo para que pueda ser degradado. Por otro lado se sabe que la principal propiedad de los ramnolípidos (RL) es su capacidad emulsificante.

La presente investigación tiene como objetivo evaluar la capacidad emulsificante de 157 cepas de *Pseudomonas spp.* hiperproductoras de RL aisladas de diferentes ambientes contaminados con petróleo, mediante los métodos de actividad emulsificante (Escalante, 2002) e Índice de emulsificación (Abouseoud *et al.*, 2008) y correlacionar su capacidad emulsificante con su capacidad de producción de RL evaluada mediante el método de revelado de RL en agar CTAB/MB (Tabuchi, 2014). Además se aportan conocimientos en la etapa más importante del proceso, que es la selección de cepas con las características más óptimas. Se obtuvieron valores de actividad emulsificante entre 0.0136 – 3.6309 UAE/ml, siendo la cepa E8 la que obtuvo el mayor valor de AE y valores de índice de emulsión entre 50.000 y 99.5151%. Siendo la cepa 3Bh-8 la que produjo mayor índice de emulsión. Sin encontrar correlación entre la actividad emulsificante e índice de emulsión con la capacidad de producción de RL de las cepas evaluadas.

ABSTRACT

Spills of petroleum hydrocarbons are one of the main sources of soil contamination and water, causing disturbances in ecosystems by affecting their structure and their bioprocesses, facing the problem of pollution produced by the oil industry, one of the effective solutions that raises is bioremediation using petroleum-degrading microorganisms. Some species of the genus *Pseudomonas spp.* produce biosurfactants that increase the bioavailability of oil so that it can be degraded. On the other hand it is known that the main property of the rhamnolipids (RL) is its emulsifying capacity. The objective of this thesis is to evaluate the emulsifying capacity of 157 strains of *Pseudomonas spp.* isolated from different environments contaminated with petroleum by means of emulsifying activity methods (Escalante, 2002) and emusification index (Abouseoud *et al.*, 2008) and correlating their emulsifying capacity with their RL production capacity evaluated by the development method of RL on CTAB / MB agar (Tabuchi, 2014) pretending to contribute in the most important stage of the process, which is the selection of strains with the most optimal characteristics. Emulsifying activity values were obtained between 0.0136 - 3.6309 UAE / ml, with strain E8 having the highest AE value and emulsion index values between 50.000 and 99.5151%. Being the 3Bh-8 strain the one that produced the highest emulsion index. No correlation was found between the emulsifying activity and emulsion index with the RL production capacity of the evaluated strains.

I. INTRODUCCIÓN

Los derrames de hidrocarburos de petróleo están considerados entre los principales contaminantes de suelos y cuerpos de agua, provocando modificaciones en los ecosistemas, alterando su estructura y sus bioprocesos. Además, la industria petrolera contamina el ambiente en distintas etapas de la explotación del petróleo (Zamora *et al.*, 2012). El proceso de extracción de hidrocarburos desde sus yacimientos es ineficiente, además, se producen pérdidas en los tanques u oleoductos y se generan accidentes en los sistemas de transporte y almacenamiento. Cuando se dan estas emergencias, los hidrocarburos alcanzan aguas y suelos, llegando a contaminar potencialmente napas subterráneas o agua superficial (Riojas *et al.*, 2010). En el Perú, la región amazónica es una de las más impactadas por derrames de hidrocarburos, debido a que en esta región la industria petrolera es una de las principales actividades económicas, por lo que se considera a la contaminación por hidrocarburos de petróleo como “importante peligro” para las zonas intangibles de la región (Yusta *et al.*, 2017).

Frente al problema de contaminación que produce la industria petrolera, una de las soluciones efectivas que se plantea para recuperar los ambientes contaminados es la biorremediación usando microorganismos degradadores de petróleo. La acción principal para estimular la degradación del petróleo por los microorganismos, es aumentar la biodisponibilidad del contaminante mediante la acción simultánea de la desorción y solubilización a través de la intervención de los biosurfactantes sintetizados por una variedad de microorganismos (Jiménez *et al.*, 2010), como es el caso de algunas especies del género *Pseudomonas*, siendo una de las etapas principales del proceso de biorremediación la selección de cepas que tengan la capacidad de producir mayor cantidad de biosurfactantes.

En el laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana, se cuenta con 2488 cepas aisladas de ambientes contaminados con petróleo, de las cuales 157 se identificaron como *Pseudomonas spp* que tienen capacidad de producir RL. La capacidad de producción de RL fue evaluada mediante el método de revelado de RL en agar CTAB/MB con ácido clorhídrico por Tabuchi (2014), este método no permite determinar la cantidad de RL que se ha producido exactamente, pero permite diferenciar cepas con productividad significativamente diferentes sometidas a similares condiciones, donde el halo de precipitación H5 es el que presenta mayor área medible, todas las cepas fueron analizadas respecto al halo H5. Se desea saber si la producción de RL evaluada mediante el método de agar CTAB-MB es directamente proporcional a la actividad emulsificante y al Índice de emulsión.

Con la presente investigación se pretende aportar conocimientos a los estudios de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo usando microorganismos, contribuyendo con la etapa más importante del proceso, que es la selección de cepas con las características más óptimas, lográndose mediante la evaluación de características propias de las cepas empleando métodos convencionales.

La biodisponibilidad es el mecanismo principal que contribuye a la biorremediación, por este motivo se considera que los biosurfactantes llamados ramnolípidos que producen las cepas de *Pseudomonas spp*. benefician de manera importante a los procesos de biorremediación, permitiendo la dispersión de contaminantes persistentes en emulsiones (Riojas *et al.*, 2010) dando lugar a una mayor posibilidad de metabolización del contaminante por parte de los microorganismos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Contaminación ambiental

Se puede definir de manera adecuada a la contaminación ambiental como la inserción de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes a los que no corresponden o en cantidades distintas a las que normalmente existen en dichos ambientes, interfiriendo con el bienestar de la población, perturbando el equilibrio ecológico y afectando los recursos naturales (Albert, 2004).

La contaminación está implícita en las actividades que realizamos diariamente, pero actualmente se le está dando mayor importancia por el incremento tanto de la frecuencia como de la gravedad de los casos de contaminación en todo el mundo. Los contaminantes pueden ser clasificados en: no degradables, de degradación lenta o persistente, degradables o no persistentes y Biodegradables (Bermúdez, 2010).

2.1.1. Contaminación por hidrocarburos

En algunos casos, el manejo y las disposiciones habituales de los hidrocarburos en la industria petrolera conllevan a la contaminación ambiental (Vasallo y Herrera, 2002). Por este motivo se considera que la industria petrolera es una de las que más afecta el medio ambiente y la biodiversidad a nivel mundial y local (Moñino, 2008).

La frecuencia de la práctica de todas las etapas, desde la exploración hasta el consumo del petróleo y sus derivados, aumentan a nivel mundial; por lo tanto, también se incrementa la amenaza de contaminación por hidrocarburos (Fingas y Fieldhouse, 2014). Se estima derrames anuales de 1.7 a 8.8 millones de toneladas métricas de petróleo a nivel global, mientras que en América del Sur un aproximado de 6000 toneladas métricas por año.

En nuestro país se han reportado emergencias de derrames de petróleo desde el año 1978 (Escalante, 2002).

La contaminación producida por hidrocarburos es capaz de generar una inmensa variedad de impactos en el medio ambiente, así como también importantes trastornos a los ecosistemas y a las poblaciones de zonas cercanas a los derrames.

2.1.2. Contaminación por hidrocarburos en el Perú

Así como la industria petrolera ha favorecido significativamente el desarrollo de nuestro país, también ha ocasionado considerables daños ambientales, estos impactos se deben principalmente a los accidentes que se originan en las distintas etapas de producción de los hidrocarburos, que vienen afectando primordialmente la región amazónica y el norte costero de nuestro país. El aprovechamiento de los principales reservorios petrolíferos hallados en territorios indígenas de la Amazonía del norte del país durante la década de los 70, sigue afectado negativamente al ambiente, contaminando recursos y ecosistemas e impactando significativamente la salud y el estilo de vida de los pueblos indígenas nativos (Stoll, 2011).

Se han producido 150 derrames de petróleo en el Perú solo entre 2009 y 2015, según un informe de la División de Supervisión de Hidrocarburos Líquidos del Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería (OSINERGMIN). Las regiones que resultaron más impactadas fueron la amazonia y la costa norte, siendo 73 las que se produjeron en las regiones de Loreto, Amazonas y Ucayali y 73 en la provincia de Talara. Por otra parte, los motivos más frecuentes de derrames fueron los atentados (82 derrames), corrosión (37 derrames) y fallas en accesorios o conexiones (12 emergencias). Se han reportado más de 285 derrames de petróleo y gas en total entre 1997 y 2016 según OSINERGMIN (2016).

2.2. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos

El proceso de remediación consiste en limpiar un ecosistema que previamente ha sido contaminado. Existen actualmente una gran cantidad de técnicas que son utilizadas para remediar suelos contaminados (Volke y Velasco, 2002), estas se pueden agrupar en Biológicos, Fisicoquímicos y Térmicos. Las técnicas biológicas consisten en la conversión de contaminantes a metabolitos inofensivos por medio de los procesos metabólicos de algunos organismos, estas técnicas pueden ser bioestimulación, biorremediación, fitorremediación, biolabranza, etc. Los procesos fisicoquímicos fundamentalmente aprovechan las características fisicoquímicas de los contaminantes para separarlos o contenerlos, finalmente los procesos térmicos, consisten en la promoción de la volatilización, desintegración o inmovilización de los contaminantes.

2.2.1. Biorremediación

La biorremediación es una técnica de remediación que mediante el proceso metabólico de microorganismos o plantas convierte contaminantes orgánicos en compuestos menos contaminantes o completamente inocuos (Glazer y Nikaldo, 1995).

Asimismo, para los procesos de biorremediación se pueden utilizar organismos nativos del lugar contaminado o microorganismos de lugares externos, es decir pueden ser realizados *in situ* o *ex situ* y en presencia o no de oxígeno. A pesar de que algunos compuestos orgánicos no son capaces de degradarse, las tecnologías de biorremediación han tenido resultados satisfactorios para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Martínez *et al.*, 2011).

Generalmente, en los suelos que sufren frecuente contaminación, la microbiota nativa se selecciona para favorecer la degradación del contaminante mediante procesos

metabólicos, lo que ocasiona una rápida transformación del contaminante en comparación con la degradación de la materia orgánica del suelo (Kästner, 2000). Sería necesaria la inoculación de microorganismos externos poseedores de capacidades degradativas específicas solamente en casos de contaminación de compuestos con alta recalcitrancia, esta técnica es llamada bioaumento. No obstante, muchas veces estas microorganismos no se adaptan adecuadamente y corren el riesgo de desaparecer (Kästner, 2000).

Los tratamientos *in situ* comúnmente utilizados son: atenuación natural, *Bioventing* aeróbico, *Bioventing* cometabólico, *Bioventing* anaeróbico, *Landfarming*, Compostaje y Biopila, biorreactores en *slurry*.

Se han reportado una gran variedad de alternativas exitosas, pero se debe tener en cuenta las características del sitio contaminado, el tipo, concentración y características fisicoquímicas del contaminante y el costo para seleccionar una técnica de remediación adecuada (Volke y Velasco, 2002).

2.1.1.1. Ventajas y desventajas de la biorremediación

Entre las ventajas que tiene la biorremediación en relación a los métodos fisicoquímicos, se considera su bajo costo, además estos métodos no afectan otros sectores ambientales y optimizan los recursos (Sabaté *et al.*, 2004).

Las técnicas de biorremediación, tal como en los tratamientos físicoquímicos, pueden ser empleadas *in situ* o *ex situ*. Estas tecnologías son preferidas en muchos casos porque tienen una serie de ventajas, como una mayor variedad de tecnologías a disposición, permiten controlar mejor el proceso y su evolución, poseen una mayor velocidad y uniformidad.

Así como las técnicas biológicas tienen ventajas, también presentan desventajas en relación a las fisicoquímicas, la más resaltante es el tiempo que toma para llegar a una buena biodegradación, a lo largo de este proceso, se da una disminución de la velocidad de degradación por un incremento de compuestos más recalcitrantes o por una reducción de la biodisponibilidad del contaminante; sin embargo, las técnicas fisicoquímicas, a pesar de tener mayor velocidad y efectividad para reducir los contaminantes, terminan modificando o eliminando completamente los microorganismos nativos del suelo, alteran los componentes fisicoquímicos del suelo y en lugar de eliminar los contaminantes los trasladan a otros ambientes (Sabaté *et al.*, 2004).

2.1.1.2. Factores que limitan la biorremediación

Se han descrito varios factores que interfieren en la biodegradación de hidrocarburos. Uno de los más importantes es la estructura del contaminante, por otra parte, existen factores físicos como la temperatura, la humedad y el pH que deben considerarse en todos los procesos, debido a que las propiedades químicas de los compuestos contaminantes se ven directamente afectados por estos factores, como su solubilidad en agua. También se debe tener en cuenta sus características fisiológicas y la diversidad de microorganismos nativos presentes en el suelo (Das y Chandran, 2011).

Además, para que las tecnologías de biorremediación efectuadas presenten resultados positivos, es fundamental que existan nutrientes inorgánicos (nitrógeno, fósforo, potasio, etc) y aceptores de electrones. Cuando se presenta elevada cantidad de carbono orgánico, los nutrientes aprovechables pueden terminarse con mayor rapidez debido a las características del contaminante (Breedveld y Sparrevik, 2000).

Muchos autores describen que las cantidades molares de C:N:P, en relación al contenido de carbono destinado a ser degradado son altamente variadas. Según la Agencia de

Protección Ambiental (EPA) es recomendable usar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Asimismo, gran parte de los hidrocarburos que existen en los productos petrolíferos son degradados en mayor dimensión y velocidad en presencia de oxígeno, debido a que en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} y Fe^{3+}) y en ausencia de O_2 , se pueden degradar los hidrocarburos, pero con menor porcentaje de biodegradación (Martínez et al., 2011).

2.3. Emulsión

Según la RAE el significado de emulsión es “dispersión de un líquido en otro no miscible con él”. Desde otro punto de vista, una emulsión es un sistema disperso de dos o más fluidos no miscibles, uno de naturaleza polar y otro apolar. Este sistema está compuesto por una fase dispersa o interna y otra fase continua o externa, donde una de estas fases está distribuida en forma continua dentro de la otra, y además, generalmente se forma gracias a un emulsionante (surfactante) de naturaleza anfifílica con un extremo hidrofílico soluble en agua y otro extremo hidrofóbico no soluble en agua, que disminuye la tensión interfacial entre la fase apolar y polar que forma la emulsión y además le aporta estabilidad física durante un determinado lapso de tiempo.

Las emulsiones se pueden clasificar en: O/W (aceite en agua), W/O (agua en aceite) y emulsiones múltiples W/O/W y O/W/O. Las principales características de la fase oleosa son la densidad, el punto de fusión, la viscosidad, la tensión superficial y el carácter apolar. La fase W está compuesta por agua y productos de naturaleza hidrófila como sales, ácidos, bases, azúcares proteínas, tensioactivos, estabilizantes como polisacáridos y polímeros, etc.

Cuando un emulsionante actúa en una emulsión, este se moviliza y se adsorbe en la interfase, fomentando la formación de gotas con bajo consumo de energía, en otras

palabras, favorece la formación de la emulsión al reducir la tensión interfacial (Muñoz *et al.*, 2007). Las propiedades de las emulsiones, en su mayoría, dependen del tamaño y distribución de la gota, que varía entre 10 nm a 1000 μ m, y también de su disposición de tamaños. Las denominadas macroemulsiones son termodinámicamente inestables, las mini y macroemulsiones se forman con aporte de energía, mientras que las microemulsiones se dan de forma espontánea (Arteaga, 2006).

La estabilidad es una de las características más importantes de una emulsión, esta depende del resultado de un balance de fuerzas de atracción y repulsión entre las gotas de la fase dispersa regulado por las condiciones fisicoquímicas del medio continuo. De la diferencia de densidades entre ambas fases deriva la separación de éstas en un determinado lapso, dando como resultado la rotura de la emulsión.

En base a lo descrito anteriormente, como consecuencia del bajo equilibrio termodinámico de las emulsiones, las propiedades de una emulsión no están reguladas solo por variables de estado (temperatura y composición), sino también de los métodos que se utilizan para la preparación de las emulsiones, siendo imposible proponer reglas generales, si es posible destacar ciertos factores importantes que controlan estos procesos y que finalmente influirán en la estabilidad de las emulsiones (Arteaga, 2006).

2.3.1. Regla de Bancroft

Según la regla de Bancroft, la fase continua de una emulsión está constituida por la fase en la que el emulsionante es más soluble, es decir, que una emulsión O/W o W/O se forma independientemente a los porcentajes de O o de W.

Esta regla muestra cómo la estabilidad y la formación de las emulsiones están muy relacionadas con la elección del surfactante.

2.4. Los surfactantes

Los surfactantes son compuestos orgánicos que poseen como mínimo un agente liofílico y un grupo liofóbico en la misma molécula, si el surfactante será disuelto en agua o en una solución acuosa, se utilizarán los términos “hidrófilo” e “hidrófobo” respectivamente (Farn, 2008). Los surfactantes se mantienen generalmente en la interfase de manera que su grupo apolar esté orientado hacia un solvente orgánico o en la superficie mientras que su grupo polar se encuentre al interior del agua (Arteaga, 2006).

La estructura de un surfactante se esquematiza de la siguiente forma:



Figura 1. Estructura básica de un surfactante.

De las fuerzas opuestas que existen dentro de la misma molécula resultan dos fenómenos: adsorción y agregación. Las interacciones interfaciales son modificadas por los surfactantes a través de la promoción de fenómenos de adsorción, en este proceso las moléculas de surfactantes migran a la interfase con la finalidad de reducir el contacto del agua con sus grupos hidrófobos, también se puede limitar este contacto mediante la agregación de las moléculas de surfactante con los grupos hidrófilos orientados hacia la fase acuosa. Estos agregados son llamados micelas, las cuales varían de forma de acuerdo a la concentración, estas pueden ser esféricas, cilíndricas o laminares.

La siguiente figura ilustra los diversos tipos de micelas descritos anteriormente, cilíndrica, laminar y esférica.

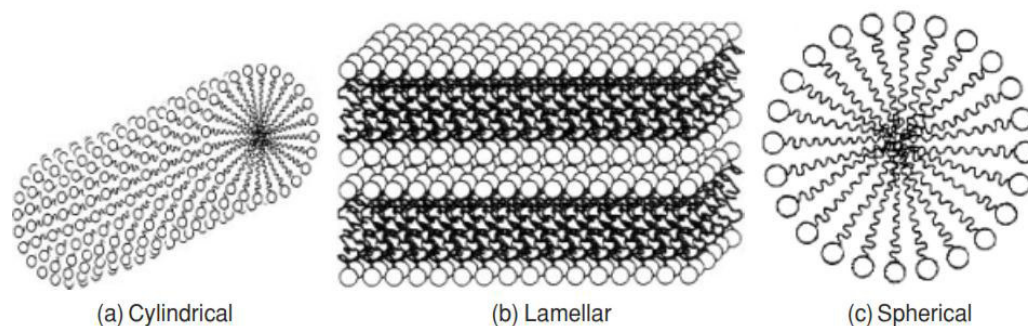


Figura 2. Tipos de micelas (Farn, 2008)

2.4.1. Propiedades de los surfactantes

Las principales propiedades de los surfactantes son la formación de agregados supramoleculares, la capacidad de formación de espuma y el aumento de humectabilidad. En cuanto a propiedades que están relacionadas con las asociaciones moleculares se encuentra la micelización, que es la formación de agregados moleculares a consecuencia de la superación de la Concentración Micelar Crítica (CMC) de surfactante, y en relación con ellos la solubilización de compuestos que no son solubles en agua dentro de las micelas o distintos agregados supramoleculares (Arteaga, 2006).

2.4.1.1. Concentración micelar crítica (CMC)

La Concentración Micelar Crítica (CMC) se define como la concentración de surfactante en la que se logra la menor tensión superficial, es también la concentración mínima de surfactantes que conlleva a la formación espontánea de micelas, es un valor particular para cada surfactante. Cuando se dan valores menores a esta concentración, todo

el surfactante que se encuentra en la solución está en forma de monómeros dispuestos en la interfase (Jiménez *et al.*, 2010).

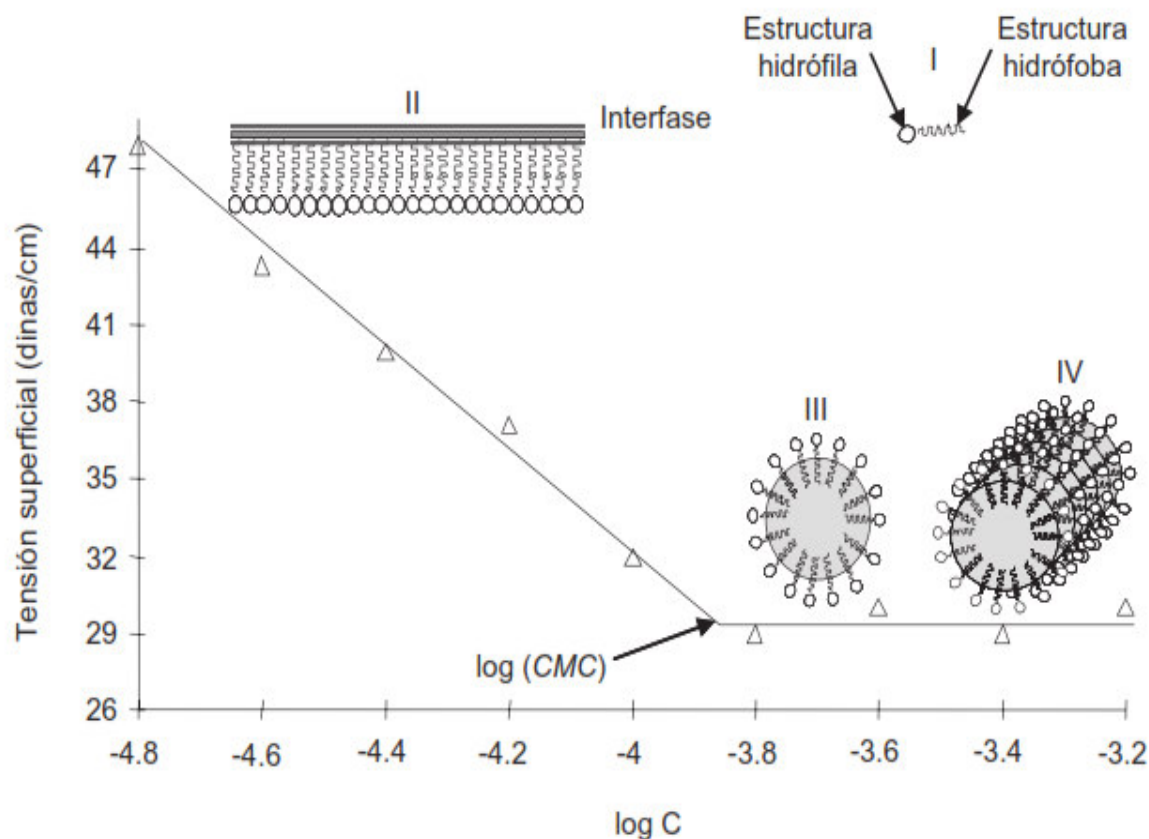


Figura 3. Representación de los surfactantes al llegar a la concentración micelar crítica (CMC) (Jiménez *et al.*, 2010)

2.4.1.2. Numero de agregación (n_a)

El n_a es un valor que muestra la cantidad promedio de moléculas de surfactantes que forman las micelas. Generalmente los agregados micelares contienen entre 20 - 100 monómeros (Jiménez *et al.*, 2010).

2.4.1.3. Escala HLB

La escala HLB es el valor que muestra la capacidad de un surfactante para constituir emulsiones estables, se comparan con valores estándar establecidos para el ácido oleico y el oleato de sodio que poseen valores de HLB de 1 y 20 respectivamente (Jiménez *et al.*, 2010). Los valores de HLB próximos a 1 demuestran que el surfactante tiene la capacidad de formar emulsiones estables en sistemas W/O, mientras que los cercanos a 20 indican su capacidad para constituir emulsiones estables en sistemas O/W.

2.4.1.4. Punto de nube

La temperatura afecta la solubilidad de los surfactantes en soluciones acuosas, principalmente de surfactantes no iónicos, la temperatura en la que el surfactante deja de tener solubilidad en una solución acuosa es denominada Punto de nube (Jiménez *et al.*, 2010).

2.4.2. Tipos de surfactantes

Existen surfactantes aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfóteros. En disolución acuosa los surfactantes aniónicos y catiónicos originan iones con carga negativa y positiva respectivamente, que se encargan de la actividad superficial. Los surfactantes no iónicos tienen grupos hidrófilos con alta afinidad al agua y los surfactantes anfóteros tienen estructura aniónica y catiónica en la misma molécula, teniendo mayor sensibilidad al pH.

2.4.3. Aplicación de los surfactantes

Los surfactantes son un conjunto de compuestos químicos que utilizamos diariamente, tienen una gran variedad de aplicaciones gracias a la cantidad de

características interesantes que poseen y por su amplia versatilidad. Se utilizan en diversas industrias como la agricultura, industria alimentaria, cosmética, productos de limpieza, petróleo y derivados, plásticos, textiles, etc. (Arteaga, 2006), además, tiene potenciales aplicaciones en diversos campos científicos como la síntesis farmacéutica de polímeros, asimismo son útiles como agentes antibacterianos, antifúngicos y antivirales, agentes adhesivos, en vacunas y terapia génica. Sus usos y preferencias son exitosos, han crecido y se han desarrollado a lo largo del tiempo en distintas aplicaciones debido a que tienen una amplia variedad en cuanto a su funcionalidad de acuerdo a los objetivos (Farn, 2008).

2.4.4. Los biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas anfífilas producidas por una amplia variedad de microorganismos. Las bacterias son las principales productoras de biosurfactantes aunque también puede ser producido por otros microorganismos como hongos y levaduras (Vandana y Singh, 2018).

Los microorganismos utilizan biosurfactantes para tener acceso a la fuente de carbono cuando estos no están a su alcance por distintos motivos, puede ser por su reducida solubilidad, por la existencia de competencia entre microorganismos o por alguna otra causa ambiental. Generalmente los biosurfactantes son metabolitos secundarios que son sintetizados en la etapa final de la fase logarítmica o en la fase estacionaria (Giraldo, 2012). Incluso ciertos microorganismos son capaces de producir biosurfactantes en condiciones extremas (Jiménez *et al.*, 2010).

En los últimos años, la notoriedad de los surfactantes de origen microbiano ha ido aumentando principalmente porque tienen una toxicidad muy reducida, por ser altamente biodegradables, por tener una acción específica (Mulligan y Gibbs, 2004) y porque se pueden producir en grandes cantidades mediante el uso de sustratos renovables más

baratos, ya que las fuentes potenciales de carbono provienen de diversas industrias, como los desechos agrícolas (azúcares, melazas, aceites vegetales, desechos de aceites, sustancias con almidón y suero láctico), suero de la industria láctea, desechos de destilería, grasa animal e industrias petroleras. Esto conduce a una mayor posibilidad de producción de biosurfactante y manejo ecológico de desechos industriales no deseados a costos reducidos (Vandana y Singh, 2018).

Así mismo poseen otras características que apoyan a lo mencionado anteriormente como su efectividad en temperatura, pH y salinidad extremas, además de poseer distintas estructuras y únicas que aportan nuevas características ventajosas a comparación de los surfactantes artificiales (Mohan et al., 2006).

2.4.4.1. Ramnolípidos (RL)

Los ramnolípidos son un tipo de glicolípidos extracelulares producidos principalmente por bacterias del género *Pseudomonas*, este biosurfactante fue descubierto a partir de 1949 (Maqsood y Jamal, 2011), son llamados metabolitos secundarios, por lo que su producción coincide con el inicio de la fase estacionaria, se conoce que pueden ser producidos a partir de una amplia variedad de sustratos (Giraldo, 2012), pero también requiere condiciones de crecimiento apropiadas. Los RL tienen aplicaciones biotecnológicas potenciales, sin embargo, son producidos por *P. aeruginosa* con diferentes rasgos asociados con la virulencia (Soberón – Chávez et al., 2005).

Estructuralmente los ramnolípidos están constituidos por una cabeza hidrofílica, la cual puede contener una o dos moléculas de ramnosa, por lo que son llamados mono- o di-ramnolípidos respectivamente, y además poseen una cola hidrofóbica que está compuesta por uno o dos ácidos grasos (EL – Amine et al., 2012).

Han sido descubiertos aproximadamente 28 isotipos de RL que se diferencian entre sí por tener una estructura con distinta cantidad de unidades de sacáridos, así como por el número de cadenas alquilo presentes en la parte lipofílica, su cantidad de átomos de carbono y la presencia de insaturaciones (Sánchez, 2010).

2.4.4.2. Los biosurfactantes en el incremento de la biodisponibilidad

Para alcanzar la biodegradación es necesaria la biodisponibilidad del contaminante, por lo que este es el principal objetivo en el área de la biorremediación. Los contaminantes que se encuentran difícilmente biodisponibles son los que tienen naturaleza hidrófoba (Riojas *et al.*, 2010). La degradación de contaminantes presentes en el suelo depende de la disponibilidad de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo y potasio), condiciones ambientales favorables (pH, conductividad eléctrica, aireación, temperatura), la naturaleza del contaminante y su biodisponibilidad.

Algunos contaminantes, como los persistentes, son extremadamente insolubles en agua y tienden a absorber fuertemente la materia orgánica en los suelos, lo que disminuye su disponibilidad para los microorganismos. El uso de biosurfactantes favorece la biodisponibilidad de tales contaminantes (Megharaj y Naidu, 2017).

El factor más importante que determina la velocidad de la degradación biológica es la biodisponibilidad, si se tiene una biodisponibilidad reducida entonces la biodegradación será más lenta, y además se tiene entendido que la bioesponibilidad disminuye a lo largo del envejecimiento del suelo. Se limita la biodisponibilidad de un contaminante cuando la acción del microorganismo se reduce por factores físicos y químicos que crean una barrera entre el contaminante y el microorganismo. Las interacciones entre los microorganismos, el suelo y los contaminantes juegan un papel muy importante en el proceso de biodisponibilidad (Riojas *et al.*, 2010).

El surfactante estimula la movilización del contaminante desde el suelo hasta la fase acuosa para que el contaminante se encuentre biodisponible, esto se da gracias a las interacciones entre el surfactante, las células y el contaminante, por lo que se puede afirmar que el papel principal de los surfactantes en el proceso de biorremediación es facilitar el transporte de los contaminantes en el suelo (Gómez *et al.*, 2008).

2.4.4.3. Aplicación de surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

La biorremediación implica la aceleración de procesos biodegradativos naturales en ambientes contaminados al mejorar la disponibilidad de materiales, condiciones y microorganismos predominantes. La adición de surfactantes es ventajosa cuando el crecimiento bacteriano es lento o cuando los contaminantes consisten en compuestos que son difíciles de degradar (Ron y Rosenberg, 2002). En los procesos de biorremediación de contaminantes recalcitrantes son fundamentales los biosurfactantes dado que los hidrocarburos de alto peso molecular y baja solubilidad pueden adsorberse en los microporos presentes en las partículas del suelo, siendo inaccesibles para los microorganismos como fuentes de carbono y energía. Ante este escenario, los surfactantes aumentan la biodisponibilidad mediante la acción simultánea de la desorción y solubilización del contaminante (Jiménez *et al.*, 2010).

Cuando se adicionan surfactantes a suelos impactados con contaminantes persistentes que tienen baja solubilidad en agua como el petróleo crudo, estos favorecen su fácil dispersión en emulsiones mediante la reducción de la tensión interfacial entre el petróleo crudo y el agua, el surfactante tendrá la tendencia a reducir la fuerza capilar que mantiene unidos el petróleo crudo y el suelo, esta reducción en la fuerza capilar debido a la reducción de la tensión interfacial mejorará la separación del petróleo de un medio poroso (Pekdemir *et*

al., 2005). Este proceso facilita la movilización del contaminante para que los microorganismos tengan mayor acceso a este, favoreciendo su metabolismo con el hidrocarburo, induciendo el aumento de la actividad enzimática y el transporte de los compuestos orgánicos de las células microbianas (Riojas *et al.*, 2010).

Sin embargo, en el proceso de lavado del suelo, si las emulsiones son altamente viscosas, y si una vez formadas son relativamente inmóviles y pueden aumentar el volumen de contaminantes, esto podría reducir el flujo de surfactantes durante el tratamiento del suelo, lo que obstaculizaría su permeabilidad y contacto interfacial con el suelo contaminado (Pekdemir *et al.*, 2005).

Los suelos contaminados con hidrocarburos tienen en su composición mayor cantidad de microorganismos pero con menor diversidad ya que se seleccionan de manera natural específicamente los que son capaces de sintetizar dicho sustrato (Riojas *et al.*, 2010). Se tiene referencia que los microorganismos con mayor importancia en la degradación son: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Nocardia* (Helmy *et al.*, 2009).

En los últimos años, muchas investigaciones se han centrado en el estudio de los biosurfactantes por sus distintas propiedades, pero recientemente los biosurfactantes se han estudiado ampliamente para sus aplicaciones en las industrias de remediación, debido a la frecuente contaminación del suelo y aguas subterráneas por hidrocarburos orgánicos. Frente al efecto negativo sobre el agua y las propiedades del suelo causada por la contaminación de hidrocarburos, que presentan resistencia a distintos tipos de degradación, toxicidad para los seres vivos y estabilidad química intrínseca, una de las mejores alternativas es la biorremediación para la limpieza del suelo y el agua subterránea, considerado como una tecnología ecológica y efectiva para los sitios que están contaminados principalmente con hidrocarburos (Karlapudi *et al.*, 2019).

Los surfactantes se pueden aplicar como un aditivo para estimular el proceso de biorremediación; sin embargo, con tecnologías genéticas avanzadas, se espera que el aumento de la concentración de bioemulsificantes durante la biorremediación se logre mediante la adición de bacterias que sobreproducen los bioemulsionantes (Ron y Rosenberg, 2002).

Los biosurfactantes tienen la ventaja de tener menor toxicidad en relación a los surfactantes sintéticos, además pueden biodegradarse con facilidad, optimizan el proceso de degradación de los hidrocarburos, aumentado la solubilidad y biodisponibilidad del contaminante mediante los procesos anteriormente descritos y pueden ser producidos a partir de una gran variedad de sustratos y a un bajo costo. Así mismo, poseen ciertas desventajas que limitan su potencial uso en los procesos de remediación, como la complejidad de su producción a gran escala y la competencia entre los hidrocarburos y otros compuestos como sustratos preferenciales para los microorganismos.

2.4.4.4. Selección de microorganismos productores de biosurfactantes

El muestreo y el aislamiento son básicos para la selección de microorganismos productores de biosurfactantes. Existe mayor probabilidad de obtener aislamientos exitosos en las zonas contaminadas con hidrocarburos, sin descartar los sitios que no han sido alterados, donde también se han aislado microorganismos con capacidad degradativa. Así mismo han sido desarrolladas muchas técnicas para el aislamiento y selección de microorganismos con importancia degradativa, principalmente basadas en la superficie o actividad interfacial del sobrenadante del cultivo (Walter *et al.*, 2013).

El objetivo principal es hallar estructuras nuevas con una alta actividad interfacial, baja concentración crítica de micelas (CMC), alta capacidad de emulsión, buena solubilidad, actividad en un amplio rango de pH y económicamente viables (Walter *et al.*, 2013). Además,

es indispensable encontrar métodos sensibles, fáciles de realizar (Thavasi *et al.*, 2011) y con capacidad de seleccionar muchos candidatos rápidamente (Chen *et al.*, 2007). Los métodos de selección pueden dar resultados cualitativos y/o cuantitativos; aunque con el objetivo de una selección primaria de cepas, los métodos cualitativos son suficientes generalmente.

III. HIPOTESIS

La capacidad de producción de Ramnolípidos de cepas de *Pseudomonas spp* aisladas de ambientes contaminados con petróleo tiene relación con su capacidad emulsificante sobre hidrocarburos de petróleo.

3.1. Variables de la investigación

3.1.1. Variable independiente

- Cepas nativas de *Pseudomonas spp*.

3.1.2. Variable dependiente

- Actividad emulsificante (UAE/ml)
- Índice de emulsificación (%)
- Área de halo H5 de precipitación de RL (cm²)

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad emulsificante sobre hidrocarburos de petróleo de cepas de *Pseudomonas spp* productoras de RL aisladas de ambientes contaminados con petróleo.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad emulsificante de las cepas de *Pseudomonas spp.* mediante la prueba de actividad emulsificante sobre petróleo crudo.
- Determinar el índice de emulsificación (IE24) de las cepas de *Pseudomonas spp.* sobre petróleo crudo.
- Correlacionar estadísticamente la actividad emulsificante e índice de emulsificación con las áreas del halo H5 de precipitación de ramnolípidos de las cepas en estudio.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

Se trabajó con 157 cepas previamente seleccionadas como productoras de RL, con áreas de halo H5 de precipitación de RL logradas mediante el método CTAB – MB - HCl e identificadas como *Pseudomonas spp.* (Tabuchi, 2014) obtenidas del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

5.2. Reactivación de cepas

1. Para la reactivación de las cepas de *Pseudomonas spp.* se emplearon tubos con 3 ml de caldo nutritio.
2. Se inoculó cada cepa a los tubos con caldo nutritio y fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.
3. Pasado el tiempo de incubación, las cepas fueron sembradas sobre agar nutritio para verificar su pureza.
4. Una vez confirmada su pureza, se procedió a sembrar en los ceparios de trabajo respectivos.

5.3. Actividad emulsificante

Se empleó la metodología descrita por Goldman y col. (1982) modificada por Escalante (2002).

1. Se utilizó 18 ml de medio mínimo de Goldman al cual se le adicionó extracto de levadura al 3% (P/V) y posteriormente etanol, con un pH inicial de 7.2.

2. Se inoculó 2 ml de cultivo y se incubó en agitación durante 72 horas a 37°C.

5.3.1. Preparación de la emulsión

1. Pasado el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos.
2. A 10 ml del sobrenadante se le agregó 0.2 ml de petróleo crudo y se agitó manualmente durante 5 minutos.
3. Finalmente se dejó reposar durante 1 min y se procedió a realizar la lectura de la preparación al espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda. Donde una unidad de actividad emulsificante (UAE/ml) es igual a 0.816 de D.O.

Se realizó todo el procedimiento por triplicado para cada cepa.

5.4. Índice de emulsificación (E24)

El índice de emulsión E24 de las muestras de cultivo se determinó usando la metodología descrita por Abouseoud (2008).

1. Se emplearon tubos con 2 ml de cultivo en caldo nutritivo con un pH inicial de 7.2, incubado durante 24 horas a 37°C.
2. Al término de la incubación se le adicionó 2 ml de petróleo crudo.
3. Se mezcló durante 5 minutos y se dejó reposar durante 24 h.
4. El índice de emulsión se obtiene al dividir la altura total de la mezcla sobre la altura de la emulsión.

Se realizó todo el procedimiento por triplicado para cada cepa.

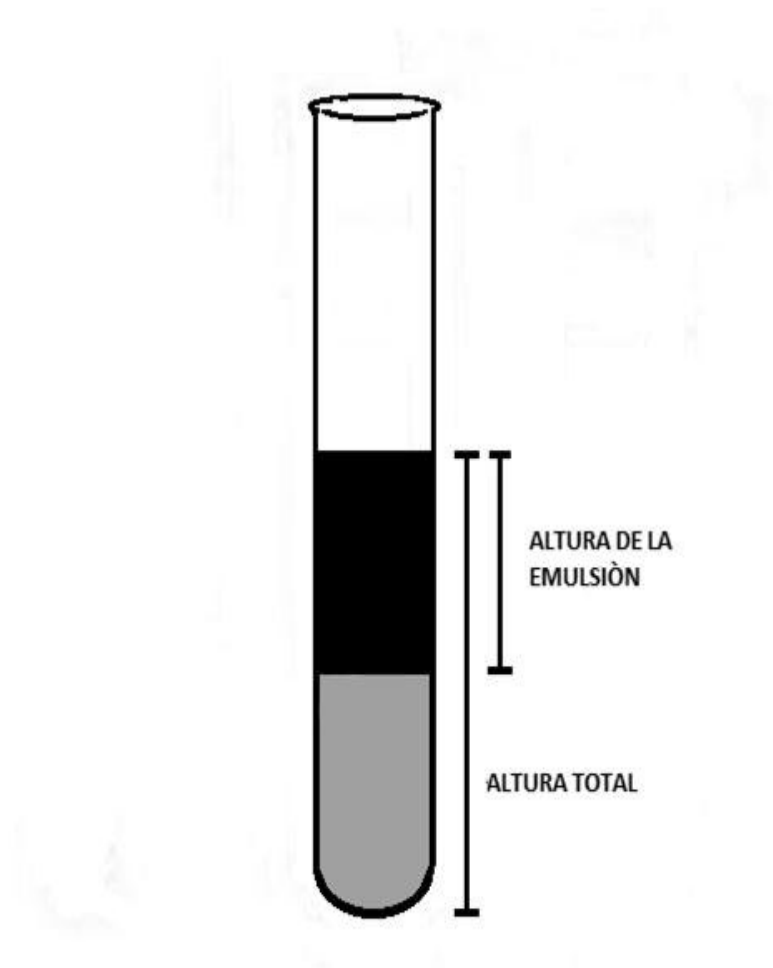


Figura 4. Esquematización de la medición de la emulsión para obtener el índice de emulsión.

5.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron usando el software estadístico IBM SPSS Statistics Versión 24.0 (IBM Corp. Lanzado en 2016. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.) para determinar su tipo de distribución y analizar la existencia de diferencias significativas entre los valores de los resultados obtenidos para las pruebas de capacidad emulsificante e índice de emulsificación versus área del halo H5 de precipitación de cepas de *Pseudomonas spp* productoras de RL.

VI. RESULTADOS

6.1. Actividad emulsificante

En la tabla 1 se muestran los estadísticos de los valores de Actividad Emulsificante obtenidos de las 157 cepas de *Pseudomonas spp* evaluadas, donde se puede observar los principales datos que describen en forma resumida el comportamiento de los resultados de actividad emulsificante,

Tabla 1. Estadísticos de Actividad emulsificante (UAE/ml) de las 157 cepas de *Pseudomonas spp*. Evaluadas.

ESTADÍSTICOS	VALORES OBTENIDOS (UAE/ml)
Media	0.535954
Mediana	0.181968
Moda	0.0136a
Desviación estándar	0.7150725
Varianza	0.511
Rango	3.6173
Mínimo	0.0136
Máximo	3.6309

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

Así mismo, al evaluar las 157 cepas de *Pseudomonas spp*, se obtuvieron valores de actividad emulsificante que varían entre 0.0136 y 3.6173 UAE/ml. Los resultados fueron ordenados de menor a mayor y se presentan en la figura 5, donde se puede apreciar en forma general las cepas evaluadas con su respectivo valor de actividad emulsificante en UAE/ml.

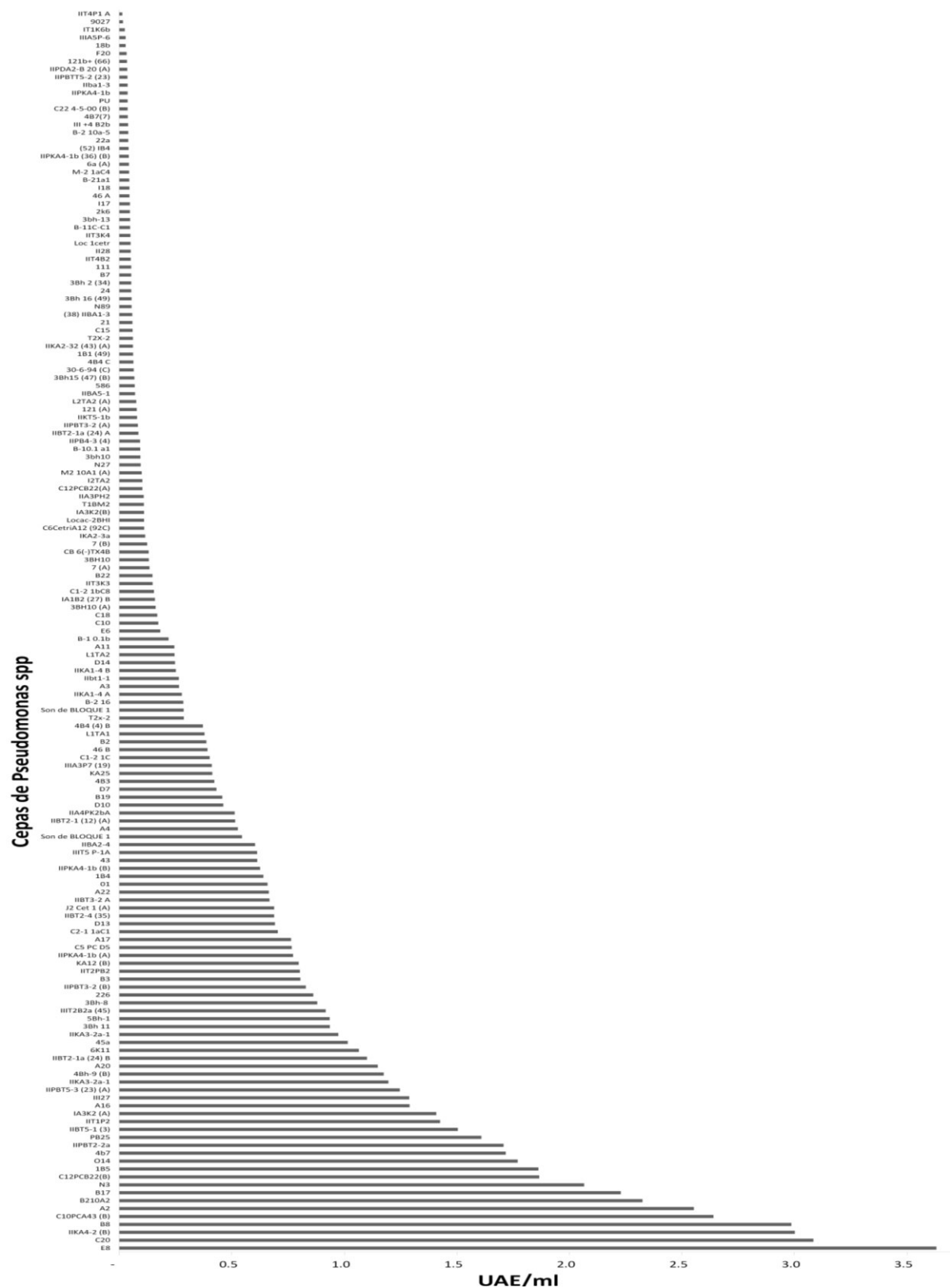


Figura 5. Valores de Actividad Emulsificante en UAE/ml de las 157 cepas de *Pseudomonas* spp., ordenadas de menor a mayor (Tabla 9).

A continuación, en la figura 6, se aprecia la cantidad de cepas que se obtuvieron en cada rango de AE (UAE/ml). La figura evidencia que en el rango mínimo de actividad emulsificante [0.0 a 0.1] UAE/ml se encuentra una mayor cantidad de cepas, mientras que en los rangos de mayor actividad emulsificante se encuentran menos cantidad de cepas, ocupando solo 3 cepas el rango de mayor actividad emulsificante [3.0-4.0] UAE/ml.

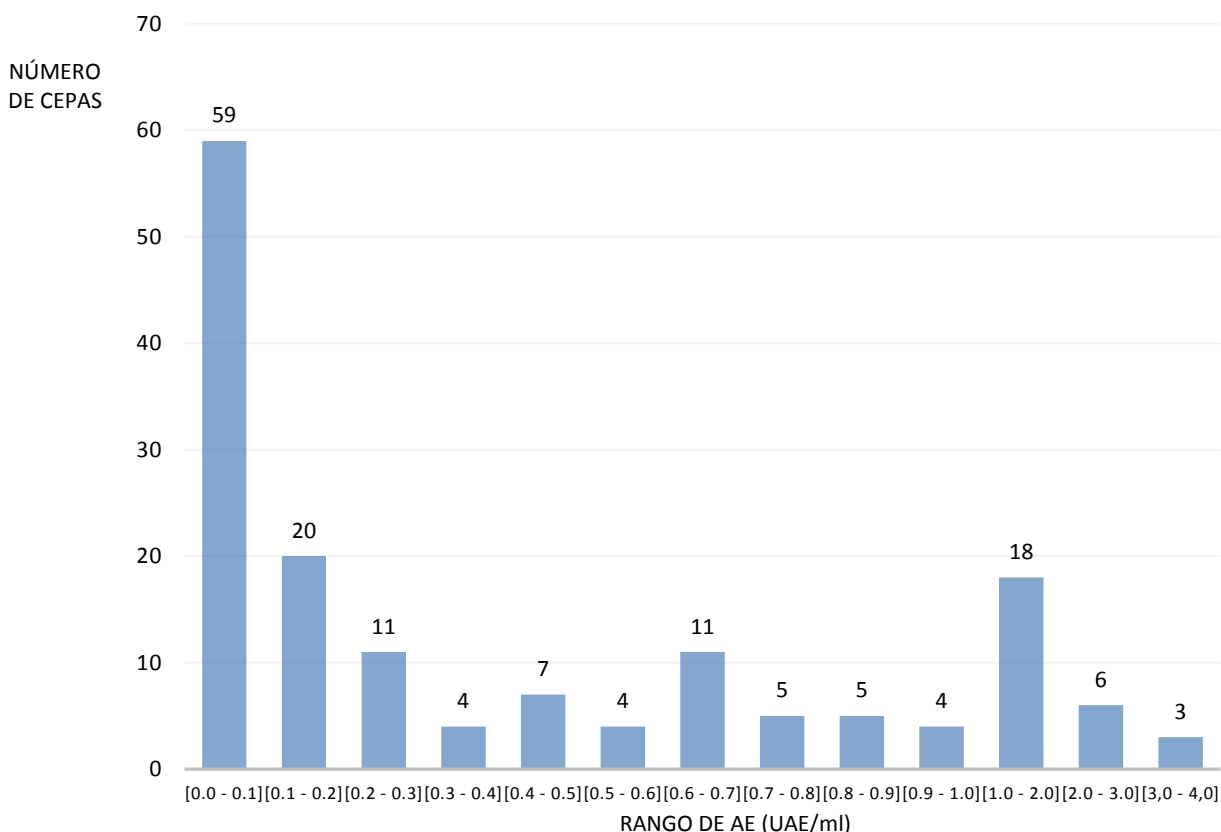


Figura 6. Rangos de valores de actividad emulsificante y la cantidad de cepas que obtuvieron valores dentro de cada rango.

En la figura 7 se muestra un diagrama de caja y bigotes de los valores de actividad emulsificante obtenidos. Se pueden observar los valores atípicos, que están alejados de la mayoría de datos. Además esta figura nos da una visión general de la asimetría del conjunto de datos y su dispersión. En este caso se están incluyendo en los análisis todos los datos, incluso los atípicos,

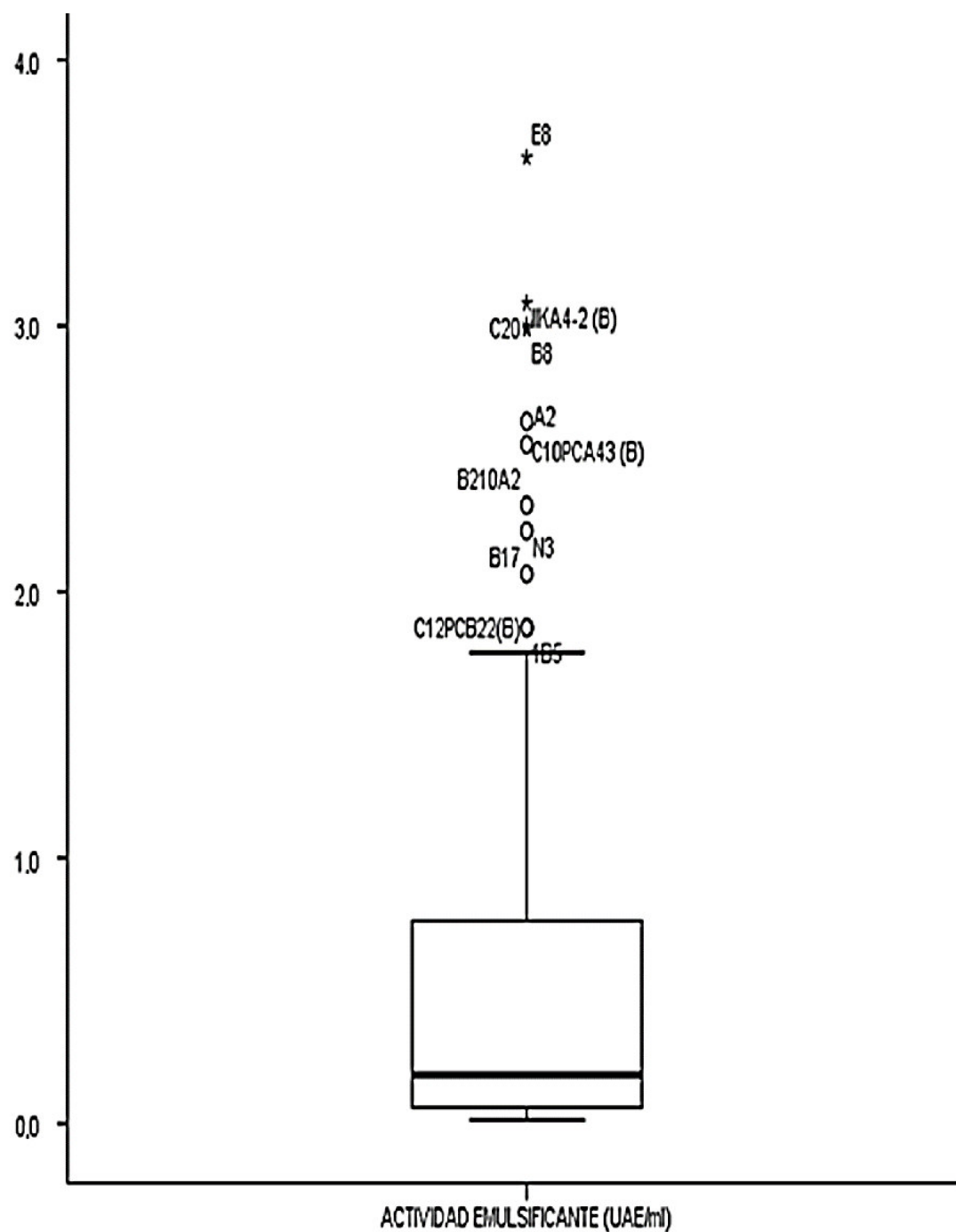


Figura 7. Diagrama de caja y bigotes de la actividad emulsificante de las 157 cepas de *Pseudomonas* spp. evaluadas.

Tabla 2. Relación de cepas con valores atípicos de actividad emulsificante donde se indica también su área de halo H5 de producción de RL.

Cepas de <i>Pseudomonas spp.</i>	Tamaño de Halo H5 de producción de RL (cm²)	Actividad emulsificante (UAE/ml)
E8	1.0439	3.6309
C20	0.8842	3.0845
IKA4-2 (B)	0.7654	3.0023
B8	0.6990	2.9867
C10PCA43 (B)	0.1048	2.6400
A2	1.0627	2.5535
B210A2	0.6497	2.3248
B17	0.5046	2.2285
N3	1.0364	2.0658
C12PCB22(B)	0.9091	1.8665
1B5	0.0404	1.8627

6.2. Índice de emulsión

En la tabla 3 se muestran los estadísticos obtenidos de los datos de índice de emulsión IE24 de las 157 cepas de *Pseudomonas spp* evaluadas, donde se puede observar el comportamiento estadístico de los datos obtenidos.

Tabla 3. Estadísticos del Índice de emulsión (%) de las 157 cepas de *Pseudomonas spp.*

ESTADÍSTICOS	VALORES OBTENIDOS (%)
Media	70.848269
Mediana	70.114900
Moda	66.6667
Desviación estándar	12.3633066
Varianza	152.851
Rango	49.5151
Mínimo	50.0000
Máximo	99.5151

En el presente estudio se obtuvieron datos de IE24 de 157 cepas de *Pseudomonas spp.* El menor IE24 que se obtuvo fue de 50.00%, mientras que el más alto fue de 99.52%, con una media de 70.85%.

Estos valores fueron ordenados de menor a mayor y se presentan en la figura 8, donde se puede apreciar en forma general todas las cepas evaluadas con su respectivo valor de índice de emulsión (%).

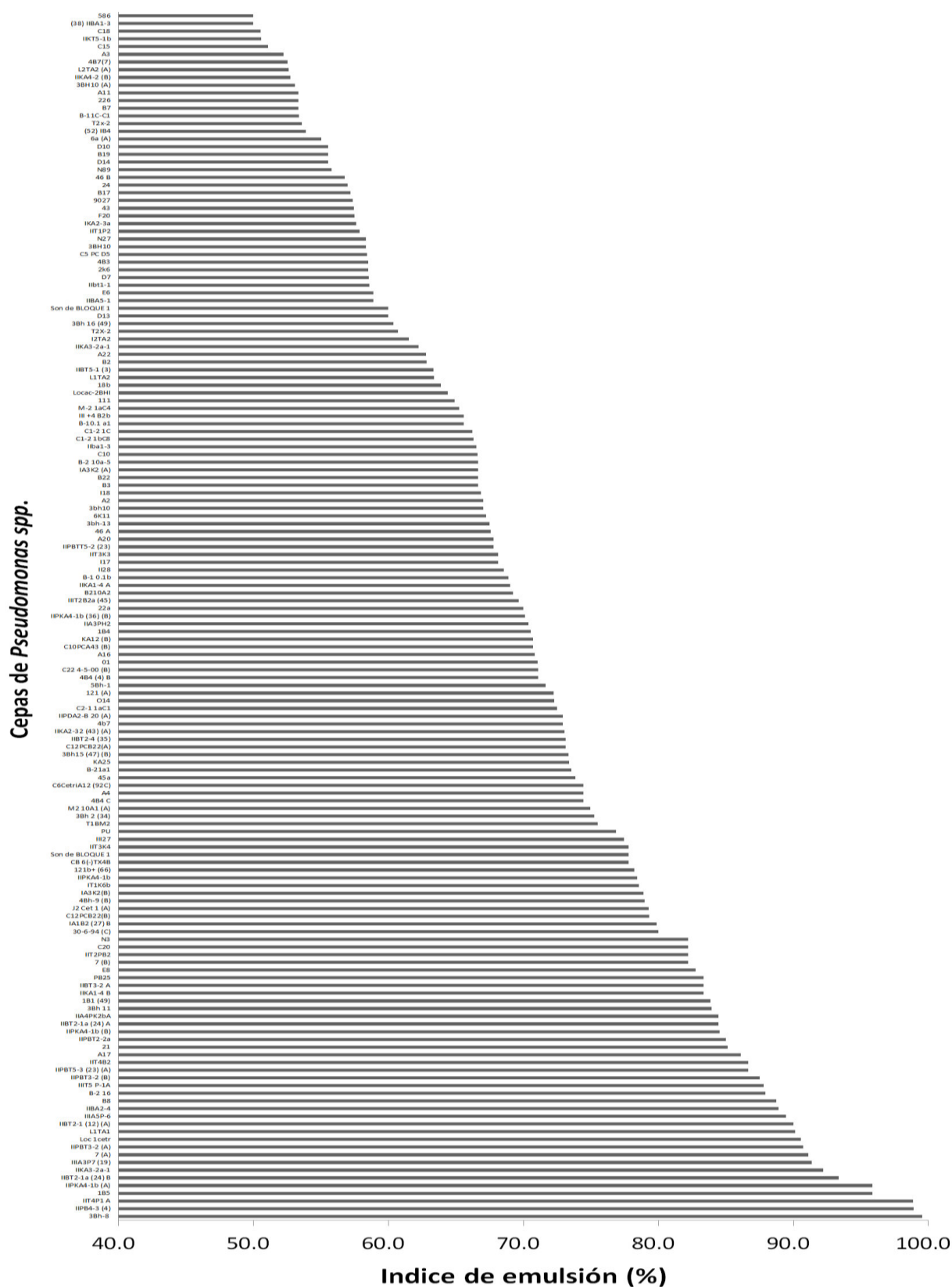


Figura 8. Índice de emulsión expresado en porcentaje de las 157 cepas de *Pseudomonas* spp. ordenadas de menor a mayor (Tabla 10).

A continuación la Figura 9 es un gráfico de barras que muestra rangos de índice de emulsión donde se ubican los valores obtenidos de IE24 de las 157 cepas de *Pseudomonas spp.* evaluadas. Se puede observar la cantidad de cepas que obtuvieron valores en cada rango de índice de emulsión, hay una mayor cantidad de cepas que tiene un IE24 en el rango entre 70 - 80%, que es un valor intermedio, mientras que una menor cantidad de cepas se ubica en el mayor rango entre 90 y 100%.

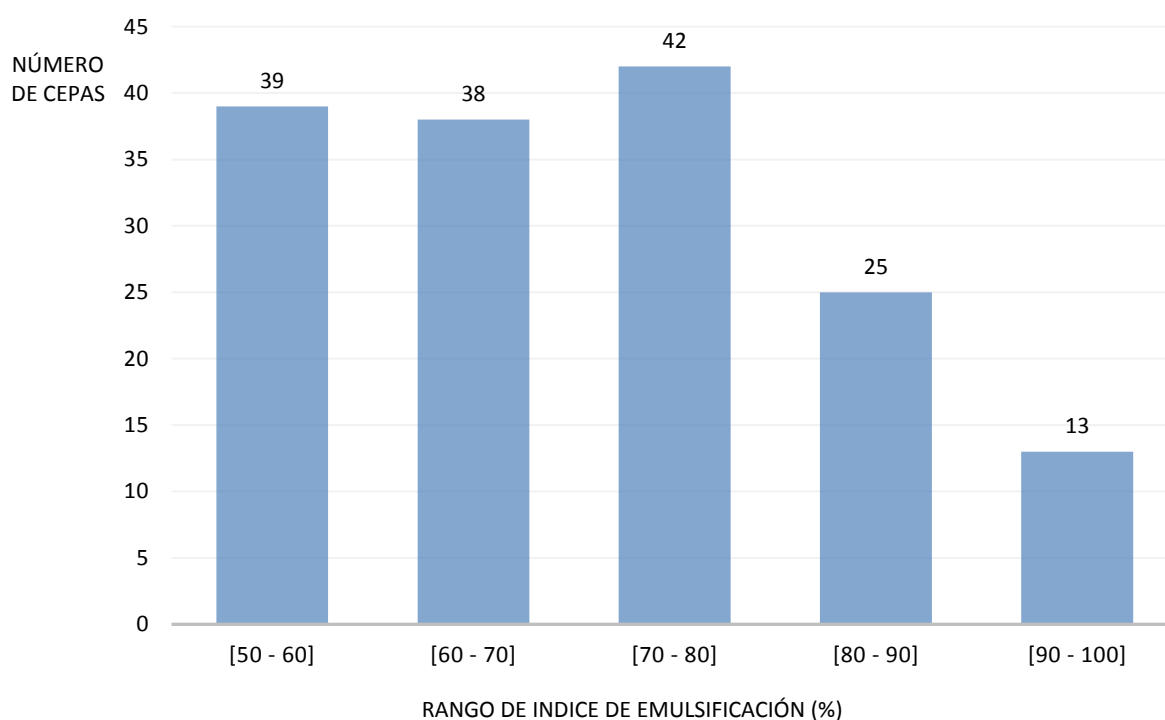


Figura 9. Rangos de índice de emulsión de las 157 cepas de *Pseudomonas spp.*, evaluadas.

De las 157 cepas de *Pseudomonas spp.* evaluadas en la presente investigación, 42 presentaron un IE24 en el rango de 70% y 80%, fue el rango donde se ubicaron la mayor cantidad de cepas, la menor cantidad de cepas (13) estuvieron en el rango entre 90 y 100% de índice de emulsión, que representa el 8.28% del total de cepas evaluadas.

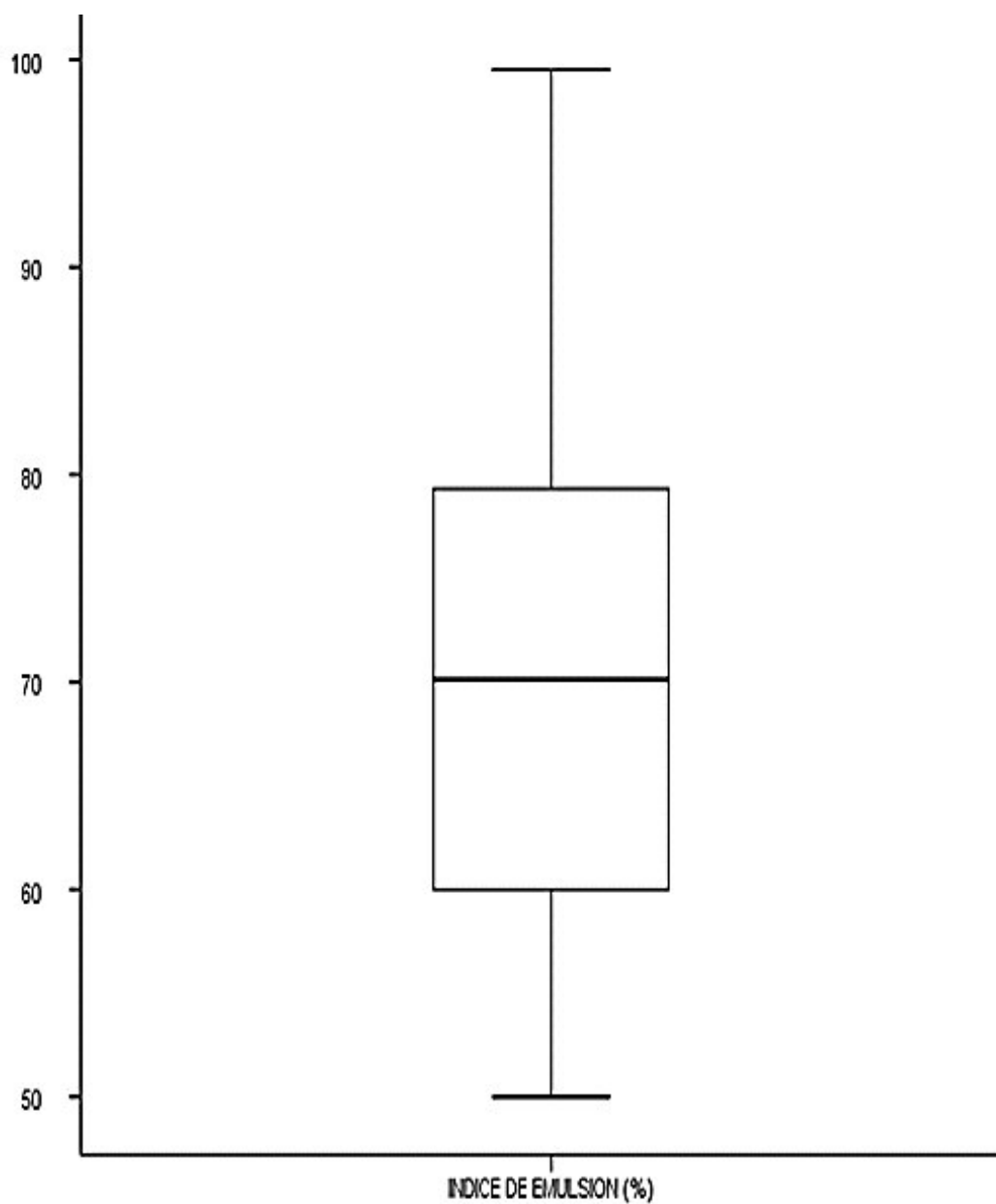


Figura 10. Diagrama de caja y bigotes para el índice de emulsión de las 157 cepas de *Pseudomonas* spp. evaluadas.

En la Figura 10 se evidencia que la variable índice de emulsión, no tiene valores atípicos que sobresalgan entre la mayoría de datos, además nos da una visión general de la simetría del conjunto de datos y su dispersión.

6.3. Comparación entre capacidad de producción de RL y actividad emulsificante

6.3.1. Prueba de normalidad de variables

Se realizó la prueba de normalidad para decidir si usar el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, para lo cual se utilizará la prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov porque se tiene una cantidad de datos de cada variable mayor a 50.

6.3.1.1. Prueba de normalidad para variable actividad emulsificante

Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

H0: La variable tiene distribución normal

H1: La variable es distinta a la distribución normal

Nivel de significancia = 5% = 0.05

Tabla 4. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable Actividad Emulsificante (UAE/ml)

Parámetros normales^{a,b}	Media	0.535954
	Desviación estándar	0.7150699
Máximas diferencias extremas	Absoluta	0.233
	Positivo	0.210
	Negativo	-0.233
Estadístico de prueba		0.233
Sig. asintótica (bilateral)		0.000 ^c

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

El $p < 0.05$, por lo tanto, rechazamos la hipótesis nula, entonces se puede afirmar que la variable Actividad Emulsificante es distinta a la distribución normal.

3.1.1.1. Prueba de normalidad para variable índice de emulsión

H0: La variable tiene distribución normal

H1: La variable es distinta a la distribución normal

Nivel de significancia=5%=0.05

Tabla 5. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable Índice de Emulsión (%)

Parámetros normales^{a,b}	Media	70.848269
	Desviación estándar	12.3633066
Máximas diferencias extremas	Absoluta	0.075
	Positivo	0.075
	Negativo	-0.057
Estadístico de prueba		0.075
Sig. asintótica (bilateral)		0.030 ^c

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

El $p < 0.05$, por lo tanto, rechazamos la hipótesis nula; es decir, la variable Índice de Emulsión es distinta a la distribución normal.

3.1.1.2. Prueba de normalidad para la variable área de halo H5 de precipitación de RL

H0: La variable tiene distribución normal

H1: La variable es distinta a la distribución normal

Nivel de significancia=5%=0.05

Tabla 6. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable área de halo H5 de RL

Parámetros normales^{a,b}	Media	0.640044
	Desviación estándar	0.3866988
Máximas diferencias extremas	Absoluta	0.074
	Positivo	0.074
	Negativo	-0.052
Estadístico de prueba		0.074
Sig. asintótica (bilateral)		0.034 ^c

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

El $p < 0.05$ entonces rechazamos la hipótesis nula, por lo tanto, la variable Halo H5 de precipitación RL es distinta a la distribución normal.

6.4. Coeficiente de correlación

6.4.1. Coeficiente de correlación entre la actividad emulsificante y la producción de Ramnolípidos.

Se ha evaluado la capacidad emulsificante y se tiene resultados de capacidad de producción de RL de las cepas de *Pseudomonas spp.*; se desea saber si existe o no correlación entre ambas variables, para lo cual se realiza el siguiente análisis estadístico.

Intervalos de confianza para la media al 95%:

Planteamiento de la hipótesis:

H0 = No existe correlación entre la actividad emulsificante y el área de halo H5 de precipitación de RL.

H1 = Existe correlación entre la capacidad emulsificante y el área de halo H5 de precipitación de RL.

Nivel de significancia: 5% = 0.05

Valor de $p = 0.813$

Valor de $r = -0.01$

Tabla 7. Prueba de coeficiente de correlación Rho de Spearman entre las variables Actividad emulsificante y área de halo H5 de precipitación de RL.

		ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (UAE/ml)	AREA DE HALO H5 DE RL (cm ²)
ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (UAE/ml)	Coef. de correlación	1.000	-0.019
	Sig. (bilateral)	.	0.813
	N	157	157
AREA DE HALO H5 DE RL	Coef. de correlación	-0.019	1.000
	Sig. (bilateral)	0.813	.
	N	157	157

El valor de p es mayor a 0.05, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, que significa que No existe correlación entre la Actividad Emulsificante y el área de halo H5 de precipitación de RL.

En la figura 11 se puede apreciar la dispersión de los datos de actividad emulsificante.

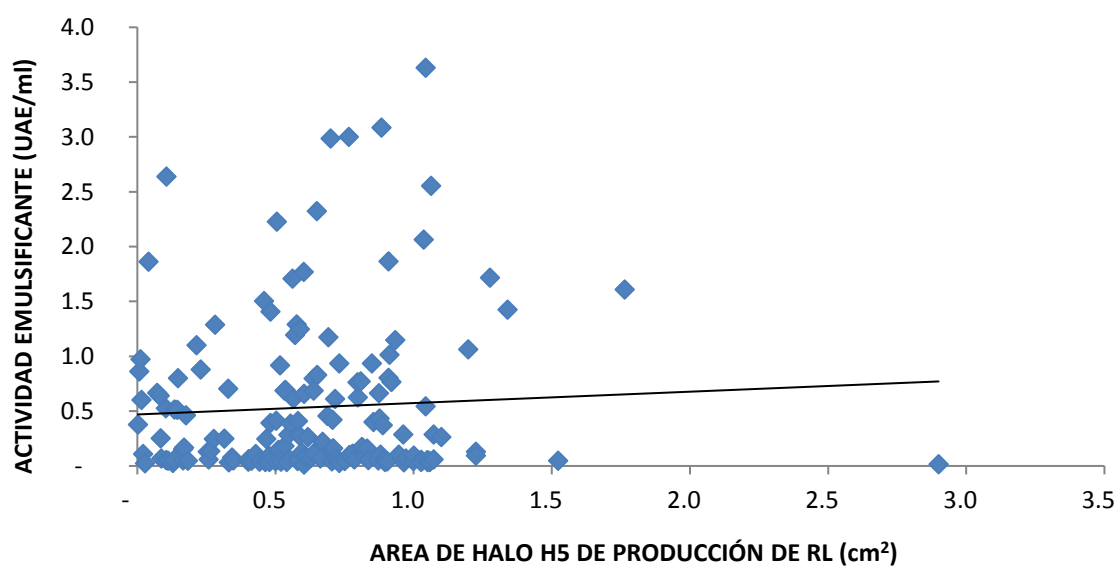


Figura 11. Grafica de dispersión entre las variables Actividad Emulsificante y Área de halo H5 de precipitación de RL.

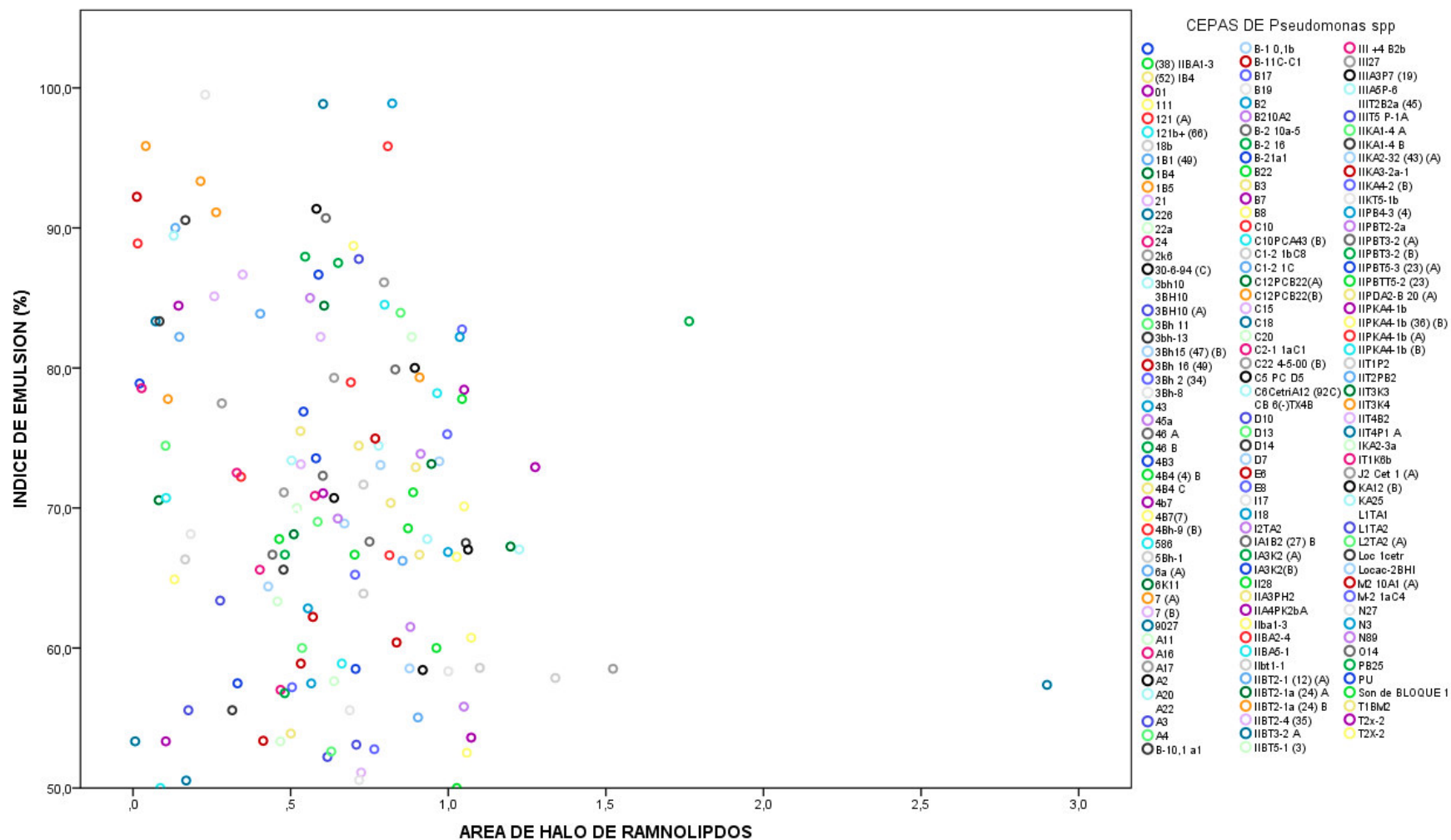


Figura 12. Grafica de dispersión entre las variables actividad emulsificante y área de halo H5 de precipitación de RL que indica el código de cada cepa.

6.4.2. Coeficiente de correlación entre el índice de emulsión y la producción de Ramnolípidos.

Se ha evaluado el índice de emulsión y se tiene resultados de área de halo H5 de precipitación de RL de las cepas de *Pseudomonas spp.* Se desea saber si existe o no correlación entre ambas variables.

Con intervalos de confianza para la media al 95%:

Planteamiento de la hipótesis:

H0 = No existe correlación entre el índice de emulsión y el área de halo H5 de precipitación de RL.

H1 = Existe correlación entre el índice de emulsión y la el área de halo H5 de precipitación de RL.

Nivel de significancia: 5% = 0.05

Valor de p = 0.022

Valor de r= -0.183

Tabla 8. Evaluación del coeficiente de correlación Rho de Spearman entre las variables índice de emulsión y área de halo H5 de producción de RL.

		ÁREA DE HALO H5 DE RL	ÍNDICE DE EMULSIÓN (%)
ÁREA DE HALO H5 DE RL	Coeficiente de correlación	1.000	-0.183*
	Sig. (bilateral)	.	0.022
	N	157	157
ÍNDICE DE EMULSIÓN (%)	Coeficiente de correlación	- 0.183*	1.000
	Sig. (bilateral)	0.022	.
	N	157	157

*. La correlación es significativa en el nivel 0.05 (bilateral).

El valor de p es menor a 0.05, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, entonces existe correlación entre el índice de emulsión y el área de halo H5 de precipitación de RL de las cepas de *Pseudomonas spp.* evaluadas.

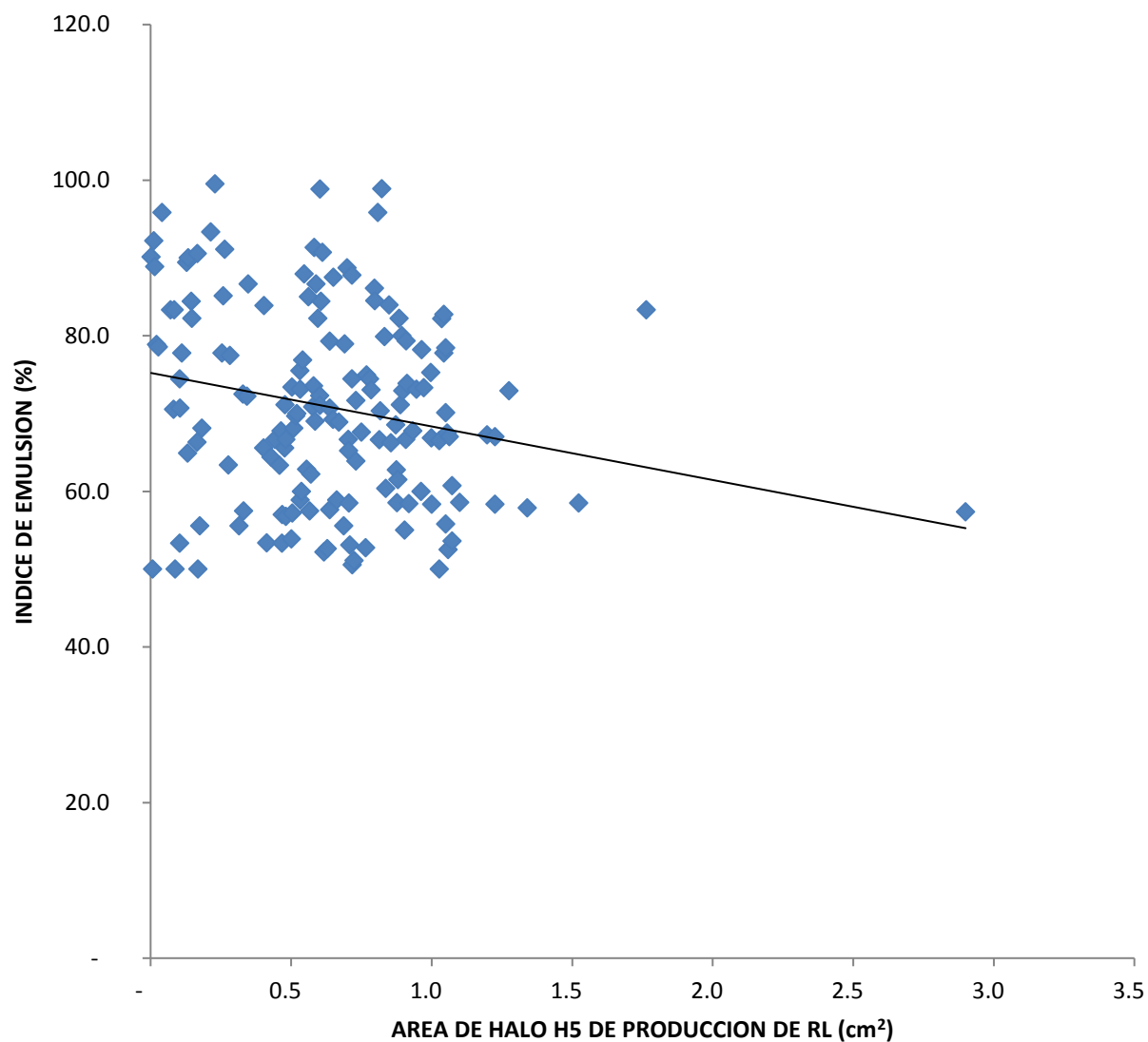


Figura 13. Gráfica de dispersión entre las variables índice de emisión y área de halo H5 de precipitación de RL

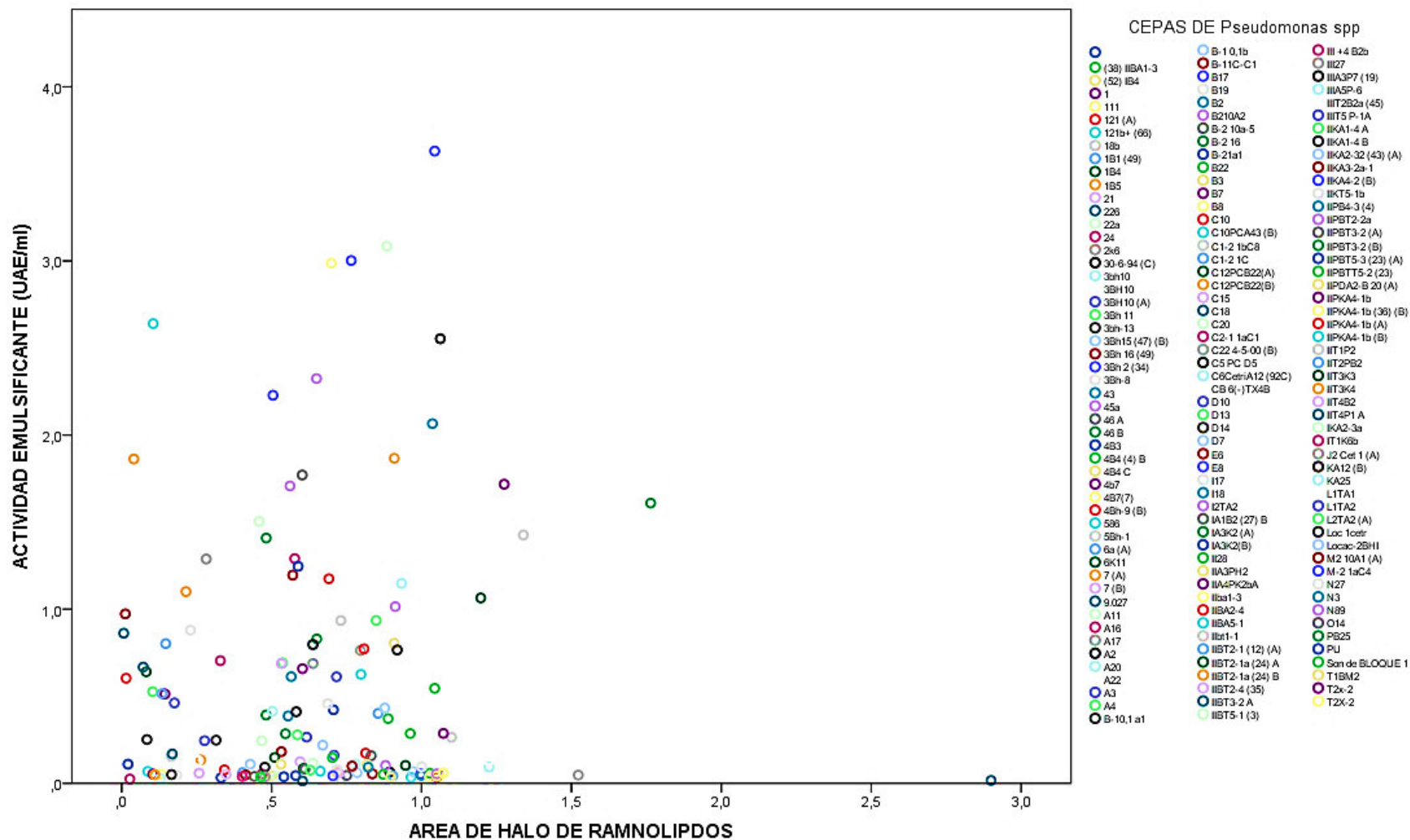


Figura 14. Gráfica de dispersión entre las variables índice de emulsión y área de halo H5 de producción de RL con sus respectivos códigos

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Actividad emulsificante

Se evaluó la actividad emulsificante de las cepas de *Pseudomonas spp* mediante un procedimiento convencional que se utiliza para seleccionar cepas con potencial en producción de biosurfactantes, en el que se aplicaron las mismas condiciones tanto de incubación del cultivo como de preparación de la emulsión, condiciones tales como temperatura, pH inicial del medio de cultivo, agitación, tiempo, material y equipos de laboratorio, esto para todas las cepas evaluadas por triplicado.

Muñoz y Alfaro (2007) afirmaron que las emulsiones son sistemas dispersos termodinámicamente inestables, y que para su preparación es necesario que se aplique energía y de esa forma tenga tendencia a romperse espontáneamente, es decir, se separen las fases que la constituyen, Arteaga (2006) dice que es por eso que el procedimiento para la obtención de la actividad emulsificante requiere tiempos y condiciones exactas que se han tomado en cuenta durante el desarrollo del método.

La preparación de la emulsión se debe hacer de forma cuidadosa, porque una mínima variación puede afectar en los resultados, según Arteaga en el 2006, dice que las características de las emulsiones no dependen solo de variables de estado, sino también se debe tomar en cuenta el método utilizado para la preparación de la emulsión. El orden y el método utilizado para la mezcla de los componentes de una emulsión también afectan en la formación y estabilidad de las emulsiones, para el caso de este método por ejemplo, el orden de los componentes que se agregan al tubo en la preparación de la emulsión, la fuerza de agitación, el tiempo de agitación, el tiempo que pasa después de la agitación hasta llevarlo al

espectrofotómetro, los trasvases, etc. afectan en el resultado final de la emulsión, por lo que se ha tenido cuidado de aplicar las mismas condiciones para todas las cepas evaluadas.

Se han obtenido valores de actividad emulsificante parecidos en comparación con otros autores. Este es el caso de Giraldo (2012), quien obtuvo una máxima actividad emulsificante de 0.5343 UAE/ml, y Escalante (2000) obtuvo entre 0.75 – 3.66 UAE/ml de actividad emulsificante. Quiliche-Duran *et al.*, (2016) analizaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de suelo en talleres de automóviles y según la prueba de actividad emulsificante, estuvieron resultados entre 1.02 UAE/ml y 2.75 UAE/ml. En el caso de la presente investigación al analizar 157 cepas de *Pseudomonas spp.* se han obtenido valores de actividad emulsificante entre 0.0136 UAE/ml hasta 3.6309 UAE/ml.

En la figura 6 se observa que tenemos mayor cantidad de cepas con valores de actividad emulsificante entre 0.0 y 0.1 UAE/ml, el 37.6% del total de cepas tienen una actividad emulsificante dentro de este rango, esto nos indica que la mayor cantidad de cepas evaluadas tienen una baja actividad emulsificante.

Se realizó un diagrama de caja y bigotes (figura 7) el cual arrojó 11 “valores atípicos” de actividad emulsificante, que van desde 1.8627 UAE/ml hasta 3.6309 UAE/ml y representan el 7% del total de cepas evaluadas, estos valores son más grandes que la mayoría de datos, por lo que podríamos considerar que estamos frente a cepas que tienen una alta AE en comparación con la AE de la mayoría de cepas que han sido evaluadas, indicando que éstas pueden tener importancia relacionada al tratamiento de ambientes contaminados con petróleo. Estas cepas son de importancia para tratamientos en los que se utilizan bacterias directamente, como el método *landfarming*.

En la tabla 2 se muestran cepas de *Pseudomonas spp.* que tienen valores atípicos de actividad emulsificante, es decir; alta actividad emulsificante y a su vez, tienen una alta producción de RL, pero no se correlacionan estadísticamente.

Debido a la naturaleza de las emulsiones y a todos los factores que intervienen en una emulsión, se recomienda utilizar este método para la selección de cepas de importancia biotecnológica teniendo en cuenta las condiciones en las que serán aplicadas; es decir, se realicen las evaluaciones bajo esas mismas condiciones para tener un resultado exacto de la actividad emulsificante.

7.2. Índice de emulsión

El ensayo de índice de emulsión es un método indirecto utilizado para detectar producción de biosurfactantes. Se asumió que si el cultivo utilizado en este ensayo contiene biosurfactantes, entonces emulsionará con los hidrocarburos presentes en la solución de prueba. El método de índice de emulsión es un ensayo popular que se basa fundamentalmente en la estabilidad de la emulsión.

Como se ha dicho anteriormente, según Arteaga (2006), Generalmente una emulsión se forma a partir de la reducción de la tensión interfacial producida por un surfactante, lo cual aporta suficiente estabilidad física a la emulsión en un determinado lapso de tiempo. Se considera a la estabilidad como una de las propiedades más importante de una emulsión, esta depende del resultado de un balance de fuerzas de atracción y repulsión entre las gotas de la fase dispersa regulado por las condiciones fisicoquímicas del medio continuo.

Los resultados de IE24 fueron más altos que los obtenidos por Saravanan y Vijayakumar en el 2012, quienes evaluaron un conjunto de cepas aisladas de ambientes contaminados con petróleo obteniendo valores de IE sobre hidrocarburos de petróleo entre

42.5 y 65.5%, y además identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* a la cepa que obtuvo el mayor valor de IE. A su vez Mohamedet *et al.* (2012) comparó IE de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* y encontró que era muy parecido para ambas cepas, con una ligera ventaja para *Pseudomonas fluorescens* con 59.95% de IE en kerosene y diesel.

El diagrama de caja y bigotes revela que no hay datos atípicos; sin embargo es necesario resaltar a tres cepas identificadas como *Pseudomonas spp.* con los códigos 3Bh-8, IIPB4-3(4) y IIT4P1 A que obtuvieron IE de 99.52%, 98.89% y 98.85% respectivamente, valores que no se han reportado hasta el momento sobre hidrocarburos de petróleo.

Los valores altos de capacidad emulsificante en muchos casos no coinciden con los de índice de emulsión, esto debido a que se están utilizando dos métodos diferentes, desarrollados a condiciones diferentes, fundamentalmente el método de índice de emulsión IE24 mide la estabilidad de la emulsión pasadas de 24 horas después de la agitación del cultivo con el crudo de petróleo, a diferencia del método de actividad emulsificante que mide la intensidad de la emulsión inmediatamente después de la agitación. Esto hace que haya una diferencia entre los resultados de ambos métodos, la actividad superficial y la capacidad de emulsificación no siempre se correlacionan. En consecuencia, según Walter *et al.* (2013), este método da solo una indicación sobre la presencia de biosurfactantes.

7.3. Correlación

Para la comparación entre las variables se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman, según Restrepo *et al.* (2007) este es un coeficiente no paramétrico alternativo al coeficiente de correlación de Pearson cuando no se cumple con el supuesto de que las variables deben estar normalmente distribuidas. Para comprobar si se cumple o no la distribución normal en nuestras variables se realizó la prueba Kolmogorov-Smirnov (Tablas

4, 5 y 6). Los resultados arrojaron que ninguna de las variables cumple con la distribución normal, por lo tanto para hacer la comparación de las variables se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

7.3.1. Correlación entre actividad emulsificante y el área de halo H5 de precipitación de RL.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la prueba de coeficiente de correlación de Spearman, el valor de p es 0.813, mayor a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula; es decir, no existe correlación entre la actividad emulsificante y el área de halo H5 de precipitación de RL en las cepas evaluadas.

Se esperaba que a mayor área de halo H5 de precipitación de RL haya una mayor actividad emulsificante, pero se han obtenido resultados diferentes a los esperados debido a que, al parecer, en la prueba de actividad emulsificante otros elementos que están presentes en el sobrenadante estarían afectando en la emulsión además de los RL.

Se conoce al género *Pseudomonas* por su gran versatilidad metabólica y plasticidad genética, generalmente crecen rápido y tienen mucha habilidad para metabolizar diversos sustratos, según Ruiz (2007). Para el desarrollo del método de actividad emulsificante se utilizó el medio mínimo de Goldman con extracto de levadura, se conocen los componentes del medio de cultivo inicial, pero se sabe que pasado el tiempo de incubación, durante crecimiento bacteriano, estos componentes varían en proporciones y composición química de acuerdo al crecimiento de cada cepa de *Pseudomonas spp.*

Los componentes del sobrenadante del cultivo que finalmente representan la fase continua de la emulsión juegan un papel muy importante. Según Tommassen *et al.* (1992) y Braun *et al.* (1998), en el sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas spp.* pueden encontrarse sustancias que la bacteria secreta al medio extracelular como proteínas, lipasas,

elastasas, fosfolipasas, exopolisacaridos, etc., se piensa que estas sustancias influyen en la actividad emulsificante que produce el RL, ya que algunas de estas poseen también actividad emulsificante, que pueden alterar el resultado final de emulsión, también algunas de estas sustancias al interactuar con los RL pueden alterar su capacidad de solubilidad en la fase continua o inhibir su capacidad de emulsión dependiendo del tipo de RL que se produzca.

Tabuchi (2014) y Calleja (2016) concluyeron que una sola cepa bacteriana produce diferentes tipos de RL. La cantidad, proporción y variedad de los diversos RL presentes en la mezcla producida dependerá del metabolismo y genoma de la cepa en particular, también de las condiciones de cultivo y de la fuente de carbono utilizada, esto asociado con los factores ya mencionados también afecta en la emulsión final.

Otro factor que tiene una estrecha relación con la actividad emulsionante de los RL es el pH, Giraldo en el 2012 evaluó diferentes valores de pH y comprobó que la capacidad de generar emulsiones de hidrocarburos con el uso de soluciones puras del RL producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25, dio valores óptimos de actividad para valores de pH iguales a 9. Así mismo, en el 2017, Cadre *et al.* evaluaron distintos valores de pH y temperatura la remoción de hidrocarburos totales de petróleo de un suelo contaminado empleando los RL producidos por *Pseudomonas aeruginosa* ORA9. Concluyendo que los dos factores influyeron significativamente, incrementándose la extracción al aumentar la temperatura y el tiempo de contacto y disminuir el pH. En el presente estudio se controló el pH inicial del medio de cultivo que tuvo para todas las cepas un valor de 7, pero se sabe que el pH varía durante el crecimiento de la bacteria y de acuerdo al tipo de RL producido le afecta de diferente manera esta variación del pH.

Como se mencionó anteriormente, también la temperatura tiene un papel fundamental tanto en el cultivo de la bacteria donde determina la cantidad y tipo de RL producido como en el mismo proceso de emulsión, Arteaga (2006) menciona que la solubilidad de los surfactantes no iónicos sufre una importante reducción cuando aumenta la temperatura hasta que alcanza la separación de fases.

Adicionalmente, se han comparado métodos estandarizados de capacidad emulsificante y producción de RL mediante la medición de tamaño de halo H5 en Agar CTAB-MB, ambos métodos se han realizado de manera independiente, no han coincidido en las condiciones de cultivo, que por todo lo antes mencionado afecta en la producción de RL y por lo tanto en la capacidad de emulsión de cada cepa.

7.3.2. Correlación entre índice de emulsión y el área de halo H5 de precipitación de RL

Como resultado del coeficiente de correlación de Spearman, en la tabla 8 se muestra que el valor de p es 0.022, menor a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, es decir existe correlación entre el índice de emulsión y el área de halo H5 de precipitación RL de las cepas evaluadas, con un índice de correlación de -0.183, un coeficiente negativo y bastante bajo, lo que indica que existe una correlación inversa bastante baja.

Como ya se había mencionado antes, el fundamento del método de índice de emulsión es la estabilidad, por lo tanto este resultado puede haberse dado a raíz de que posiblemente en lo que más afecten los otros componentes del medio sea en la estabilidad de la emulsión.

Además al igual que con el método de actividad emulsificante estamos frente a dos métodos que se han realizado de forma independiente en condiciones diferentes de acuerdo a cada método.

Según Satpute *et al.* (2008), las emulsiones preparadas con tensoactivos no iónicos muestran una mejor estabilidad (con respecto a la coalescencia) para tensoactivos con un número consistente de números hidrófilos.

En base a los resultados obtenidos, al no haber una correlación directa entre la capacidad emulsificante y la producción de RL mediante los métodos evaluados, se concluye que se debería evaluar las cepas con más de un método de detección en la selección primaria para identificar potenciales productores de biosurfactantes, se recomienda una combinación de diferentes métodos para obtener resultados más exitosos, como señalan Ariech y Guechi (2015). Lo mismo sugiere Thavasi *et al.* (2011) quien luego de su estudio propone un orden de los métodos adecuados para seleccionar cepas con importancia en la producción de biosurfactante, primero recomienda la medición de la tensión superficial > ensayo de caída del colapso = propagación del petróleo > ensayo de emulsificación.

También se recomienda que para hacer una selección de cepas usando estos métodos, estos se modifiquen de acuerdo a las condiciones en las que serán aplicados, así mismo se recomienda que para una mayor exactitud de los resultados, se apliquen estos métodos en tensoactivos purificados, que también podría ser aplicado para evaluar la capacidad de emulsión en distintos sustratos.

Los métodos utilizados en el presente estudio para evaluar capacidad emulsificante no ayudan a predecir qué cantidad de RL son producidos por cada bacteria, sin embargo, el que no haya correlación no significa que estos métodos no detecten la presencia de surfactantes, porque todas las cepas evaluadas han mostrado actividad emulsificante e índice de emulsión.

VIII. CONCLUSIONES

- Todas las cepas de *Pseudomonas spp.* productoras de ramnolípidos tienen capacidad emulsificante evidenciada mediante los métodos de Actividad Emulsificante e Índice de Emulsión.
- Del cepario evaluado, se obtuvieron cepas que presentan una alta actividad emulsificante y alto índice de emulsión.
- El método de actividad emulsificante tiene potencial para discriminar cepas de *Pseudomonas spp* con una alta capacidad emulsificante a diferencia del método de índice de emulsión, que evalúa la capacidad emulsificante pero no se pueden notar grandes diferencias entre los datos obtenidos.
- No existe correlación entre la capacidad emulsificante evaluada mediante los métodos de Actividad Emulsificante e Índice de Emulsión con la capacidad de producción de ramnolípidos evaluada mediante el método de agar CTAB-MB.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.
2. Albert, L. (2004). Contaminación ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. *EN: Toxicología ambiental*, 61-74.
3. Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3262-3268.
4. Arieche, M., & Guechi, A. (2015). Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 14(21), 1764-1772.
5. Arteaga, A. F. (2006). *Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W* (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).
6. Bamforth, S. M., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(7), 723-736.
7. Bermúdez, M. (2010). Contaminación y turismo sostenible. *Recuperado de <http://galeon.com/mauriciobermudez/contaminacion.pdf>*.
8. Billingsley, K. A., Backus, S. M., Wilson, S., Singh, A., & Ward, O. P. (2002). Remediation of PCBs in soil by surfactant washing and biodegradation in the wash by *Pseudomonas* sp. LB400. *Biotechnology letters*, 24(21), 1827-1832.
9. Bouwer, E. J., Zhang, W., Wilson, L. P., & Durant, N. D. (1997). Biotreatment of PAH-contaminated Soils/Sediments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 829(1), 103-117.

10. Breedveld, G. D., & Sparrevik, M. (2000). Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, 11(6), 391-399.
11. Braun, P., de Groot, A., Bitter, W., & Tommassen, J. (1998). Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 180(13), 3467-3469.
12. Cadre, V., Ernesto, J., Rodríguez Gámez, O., & Ábalos Rodríguez, A. (2017). Extracción de petróleo en suelo contaminado empleando ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* ORA9. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(3), 485-493.
13. Calleja Ayala, G. M. (2016). Identificación de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6k-11 contenidos en halos revelados en agar CTAB/MB con UPLC–MS/MS.
14. Chen, C. Y., Baker, S. C., & Darton, R. C. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 503-510.
15. Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
16. Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., ... & Top, E. M. (2003). Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1532-1541.
17. Deshpande, S., Shiau, B. J., Wade, D., Sabatini, D. A., & Harwell, J. H. (1999). Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Research*, 33(2), 351-360.
18. EL-Amine Bendaha, M., Mebrek, S., Naimi, M., Tifrit, A., & Belaouni, H. A. (2012). Isolation and Comparison of Rhamnolipids Production in. *Pseudomonas aeruginosa*, 2.
19. Escalante Guzmán, R. M. (2002). Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios.
20. Farn, R. J. (Ed.). (2008). *Chemistry and technology of surfactants*. John Wiley & Sons.
21. Fingas, M. (2014, May). New Models for Water-in-Oil Emulsion Formation. In *International Oil Spill Conference Proceedings* (Vol. 2014, No. 1, p. 285469). American Petroleum Institute.
22. Flathman, P. E., Jerger, D. E., & Exner, J. H. (1993). *Bioremediation field experience*. CRC Press.

23. Giraldo Z, J. D. (2012). Producción de ramnolípidos por *pseudomonas aeruginosa* Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados.
24. Glazer, A. N y Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York.
25. Grishchenkov, V. G., Townsend, R. T., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Bonner, J. S., & Boronin, A. M. (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 35(9), 889-896.
26. Goldman, S., Shabtai, Y., Rubinovitz, C., Rosenberg, E., & Gutnick, D. L. (1982). Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. *Applied and environmental microbiology*, 44(1), 165-170.
27. Guo-liang, Z., Yue-ting, W. U., Xin-ping, Q., & Qin, M. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science B*, 6(8), 725-730.
28. Helmy, Q., & Kardena, E. (2009). Performance of petrofilic consortia and effect of surfactant tween 80 addition in the oil sludge removal process. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 4(3).
29. Herman, D. C., Zhang, Y., & Miller, R. M. (1997). Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Applied and environmental microbiology*, 63(9), 3622-3627.
30. Jiménez I, D., Medina M, S. A., & gracida rodríguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos: una revisión. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 65-84.
31. Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., ramu Dirisala, V., & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4(3), 241-249.
32. Kästner, M. (2001). "Humification" Process or Formation of Refractory Soil Organic Matter. *Biotechnology Set*, 89-125.

33. Klein, J. (2000). Possibilities, limits and future developments of soil bioremediation. *Biotechnology: Environmental Processes II*, 11, 465-476.
34. Knaebel, D. B., Federle, T. W., McAvoy, D. C., & Vestal, J. R. (1994). Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in a natural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4500-4508.
35. Wagner, F., & Lang, S. (1987). Structure and Properties of Biosurfactants. In *Biosurfactants and Biotechnology* (pp. 21-25). Routledge.
36. Martínez, P, A., Pérez, L, M., Pinto E, J., Gurrola N, B. A., & Osorio R, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(3), 241-252.
37. Maqsood, M. I., & Jamal, A. (2011). Factors affecting the rhamnolipid biosurfactant production. *Pak. J. Biotechnol*, 8(1), 1-5.
38. Megharaj, M., & Naidu, R. (2017). Soil and brownfield bioremediation. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1244-1249.
39. Mesarch, M. B., & Nies, L. (1997). Modification of heterotrophic plate counts for assessing the bioremediation potential of petroleum-contaminated soils. *Environmental technology*, 18(6), 639-646.
40. Mohan, P. K., Nakhla, G., & Yanful, E. K. (2006). Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2), 279-283.
41. Moñino, N., & Galdos, A. (2008). Exposición a la contaminación por actividad petrolera y estado de salud de la Comuna Yamanunka y estado de salud de la Comuna Yamanunka (Sucumbíos, Ecuador)(Sucumbíos, Ecuador)(Tesis deficiencias ambientales). *Universitat Autònoma*.
42. Mulligan, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5), 372-378.
43. Mulligan, C. N., & Gibbs, B. F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 70(1), 31-56.

44. Muñoz, J., Alfaro, M., & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*, 58(1), 64-73.
45. Nitschke, M., Costa, S. G., Haddad, R., G. Gonçalves, L. A., Eberlin, M. N., & Contiero, J. (2005). Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1562-1566.
46. Noordman, W. H., & Janssen, D. B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4502-4508.
47. Pekdemir, T., Copur, M., & Urum, K. (2005). Emulsification of crude oil–water systems using biosurfactants. *Process Safety and Environmental Protection*, 83(1), 38-46.
48. Pérez Silva, R. M., Camacho Pozo, M. I., Gómez Montes de Oca, J. M., Ábalos Rodríguez, A., Viñas, M., & Cantero Moreno, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 39(1).
49. Quiliche-Duran, J. P. J., Lázaro, A. A. C., Grados, P. M. R., Vergara, M. Z. S., & Dueñas, L. A. H. (2016). Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente degradadoras de crudo de petróleo, provenientes de suelos en talleres de automóviles en el Norte Chico. *INFINITUM...*, 6(01).
50. Romero, S. E. G., Bustos, D. C. G., Marín, A. M. H., Rodríguez, C. Z. H., Casallas, M. L., & Vargas, P. C. M. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76-84.
51. Restrepo, L. F., & González, J. (2007). From pearson to Spearman. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(2), 183-192.
52. Rincon, M. D., & Contreras, N. (2006). Alternativa de tratamiento para tierras fuller contaminadas con aceite dieléctrico. *Scientia et Technica*, 3(32).
53. Riojas González, H. H., Torres Bustillos, L. G., Mondaca Fernández, I., Balderas Cortés, J. D. J., & Gortáres Moroyoqui, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3).

54. Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 249-252.
55. Rivera-Espinoza, Y., & Dendooven, L. (2004). Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. *Chemosphere*, 54(3), 379-386.
56. Ruiz Martínez, L. (2007). " *Pseudomonas aeruginosa*": *Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Universitat de Barcelona.
57. Sabaté, J., Vinas, M., & Solanas, A. M. (2004). Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International biodeterioration & biodegradation*, 54(1), 19-25.
58. Sánchez Martínez, M. (2010). *Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolípidos biotensioactivos* (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia).
59. Saravanan, V., & Vijayakumar, S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *J. Acad. Indus. Res*, 1(5), 264-268.
60. Satpute, S. K., Bhawsar, B. D., Dhakephalkar, P. K., & Chopade, B. A. (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria.
61. Singh, A., Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology advances*, 25(1), 99-121.
62. Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(6), 718-725.
63. Sonawane, A., Pal S., Tayade, S., Bisht N. (2015). Application of surfactant in various Fields. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, Volume 6, Issue 12, December-2015.
64. Stoll, A. (2011). Impactos Petroleros en Territorios Indígenas: Experiencias del Programa de Vigilancia Territorial del río Corrientes. *Iquitos: Ediciones Arte Gráfica*.
65. Tabuchi Yagui, T. R. (2014). Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de ramnolípidos.

66. Thavasi, R., Sharma, S., & Jayalakshmi, S. (2011). Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol. S*, 1, 1-6.
67. Thibault, S. L., Anderson, M., & Frankenberger, W. T. (1996). Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 283-287.
68. Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., & Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 103(1), 73-90.
69. Vandana, P., & Singh, D. (2018). Review on biosurfactant production and its application. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Volume 7 Number 08.
70. Vasallo, J., & Herrera, D. (2002). Seminario de hidrocarburos. *Escuela Superior de Salud y Ambiente. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén. Argentina*.
71. Velasco, J., & Volke, T. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*, 65(1), 65.
72. Volkering, F., Breure, A. M., & Rulkens, W. H. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8(6), 401-417.
73. Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In *Biosurfactants* (pp. 1-13). Springer, New York, NY.
74. Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In *Biosurfactants* (pp. 1-13). Springer, New York, NY.
75. Yusta-García, R., Orta-Martínez, M., Mayor, P., González-Crespo, C., & Rosell-Melé, A. (2017). Water contamination from oil extraction activities in Northern Peruvian Amazonian rivers. *Environmental Pollution*, 225, 370-380.
76. Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24(1), 5-12.

X. ANEXOS

Tabla 9. Datos de Actividad Emulsificante de las 157 cepas de *Pseudomonas spp* evaluadas.

CÓDIGOS DE CEPAS DE <i>Pseudomonas spp.</i>	ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (UAE/ml)
E8	3.6309
C20	3.0845
IICA4-2 (B)	3.0023
B8	2.9867
C10PCA43 (B)	2.6400
A2	2.5535
B210A2	2.3248
B17	2.2285
N3	2.0658
C12PCB22(B)	1.8665
1B5	1.8627
O14	1.7705
4b7	1.7177
IIPBT2-2a	1.7079
PB25	1.6092
IIBT5-1 (3)	1.5047
IIT1P2	1.4259
IA3K2 (A)	1.4087
A16	1.2904
III27	1.2886
IIPBT5-3 (23) (A)	1.2464
IICA3-2a-1	1.1957
4Bh-9 (B)	1.1750
A20	1.1484
IIBT2-1a (24) B	1.1008
6K11	1.0648
45a	1.0152
IICA3-2a-1	0.9732
3Bh 11	0.9354
5Bh-1	0.9351
IIIT2B2a (45)	0.9175
3Bh-8	0.8797
226	0.8622
IIPBT3-2 (B)	0.8292
B3	0.8046
IIT2PB2	0.8021
KA12 (B)	0.7971
IIPKA4-1b (A)	0.7722
C5 PC D5	0.7663
A17	0.7635
C2-1 1aC1	0.7042

D13	0.6917
IIBT2-4 (35)	0.6883
J2 Cet 1 (A)	0.6882
IIBT3-2 A	0.6677
A22	0.6650
01	0.6586
1B4	0.6407
IIPKA4-1b (B)	0.6256
43	0.6131
IIIT5 P-1A	0.6122
IIBA2-4	0.6038
Son de BLOQUE 1	0.5454
A4	0.5266
IIBT2-1 (12) (A)	0.5152
IIA4PK2bA	0.5130
D10	0.4619
B19	0.4578
D7	0.4322
4B3	0.4224
KA25	0.4136
IIIA3P7 (19)	0.4110
C1-2 1C	0.4016
46 B	0.3922
B2	0.3868
L1TA1	0.3789
4B4 (4) B	0.3714
T2x-2	0.2867
Son de BLOQUE 1	0.2861
B-2 16	0.2847
IIKA1-4 A	0.2783
A3	0.2655
IIbt1-1	0.2643
IIKA1-4 B	0.2516
D14	0.2481
L1TA2	0.2453
A11	0.2451
B-1 0.1b	0.2192
E6	0.1820
C10	0.1736
C18	0.1686
3BH10 (A)	0.1613
IA1B2 (27) B	0.1588
C1-2 1bC8	0.1541
IIT3K3	0.1483
B22	0.1477
7 (A)	0.1346
3BH10	0.1311
CB 6(-)TX4B	0.1309
7 (B)	0.1240
IKA2-3a	0.1153
C6CetriA12 (92C)	0.1110

Locac-2BHI	0.1100
IA3K2(B)	0.1099
T1BM2	0.1096
IIA3PH2	0.1088
C12PCB22(A)	0.1028
I2TA2	0.1026
M2 10A1 (A)	0.0994
N27	0.0952
3bh10	0.0938
B-10.1 a1	0.0930
IIPB4-3 (4)	0.0925
IIBT2-1a (24) A	0.0847
IIPBT3-2 (A)	0.0830
IIKT5-1b	0.0794
121 (A)	0.0778
L2TA2 (A)	0.0756
IIBA5-1	0.0699
586	0.0685
3Bh15 (47) (B)	0.0675
30-6-94 (C)	0.0645
4B4 C	0.0631
1B1 (49)	0.0617
IIKA2-32 (43) (A)	0.0609
T2X-2	0.0604
C15	0.0590
21	0.0585
(38) IIBA1-3	0.0579
N89	0.0549
3Bh 16 (49)	0.0547
24	0.0533
3Bh 2 (34)	0.0533
B7	0.0530
111	0.0530
IIT4B2	0.0511
II28	0.0509
Loc 1cetr	0.0503
IIT3K4	0.0495
B-11C-C1	0.0482
3bh-13	0.0481
2k6	0.0474
I17	0.0474
46 A	0.0453
I18	0.0452
B-21a1	0.0443
M-2 1aC4	0.0437
6a (A)	0.0427
IIPKA4-1b (36) (B)	0.0422
(52) IB4	0.0417
22a	0.0400
B-2 10a-5	0.0400
III +4 B2b	0.0394

4B7(7)	0.0378
C22 4-5-00 (B)	0.0373
PU	0.0373
IIPKA4-1b	0.0370
IIba1-3	0.0367
IIPBTT5-2 (23)	0.0362
IIPDA2-B 20 (A)	0.0354
121b+ (66)	0.0343
F20	0.0324
18b	0.0283
IIIA5P-6	0.0280
IT1K6b	0.0248
9027	0.0166
IIT4P1 A	0.0136

Tabla 10. Datos de Índice de Emulsión de las 157 cepas de *Pseudomonas spp* evaluadas.

CÓDIGOS DE CEPAS DE <i>Pseudomonas spp.</i>	ÍNDICE DE EMULSIÓN IE24 (%)
3Bh-8	99.5151
IIPB4-3 (4)	98.8889
IIT4P1 A	98.8506
1B5	95.8474
IIPKA4-1b (A)	95.8333
IIBT2-1a (24) B	93.3333
IICA3-2a-1	92.2222
IIIA3P7 (19)	91.3620
7 (A)	91.1111
IIPBT3-2 (A)	90.7046
Loc 1cetr	90.5556
L1TA1	90.1212
IIBT2-1 (12) (A)	90.0000
IIIA5P-6	89.4444
IIBA2-4	88.8889
B8	88.7223
B-2 16	87.9432
IIIT5 P-1A	87.7778
IIPBT3-2 (B)	87.5000
IIPBT5-3 (23) (A)	86.6667
IIT4B2	86.6667
A17	86.1111
21	85.1111
IIPBT2-2a	85.0000
IIPKA4-1b (B)	84.5217
IIBT2-1a (24) A	84.4444
IIA4PK2bA	84.4444
3Bh 11	83.9377
1B1 (49)	83.8710
IICA1-4 B	83.3333
IIBT3-2 A	83.3333
PB25	83.3333
E8	82.7547
7 (B)	82.2222
IIT2PB2	82.2222
C20	82.2222
N3	82.2143
30-6-94 (C)	80.0000
IA1B2 (27) B	79.8913

C12PCB22(B)	79.3231
J2 Cet 1 (A)	79.2967
4Bh-9 (B)	78.9701
IA3K2(B)	78.8889
IT1K6b	78.5548
IIPKA4-1b	78.4431
121b+ (66)	78.1980
CB 6(-)TX4B	77.7778
Son de BLOQUE 1	77.7778
IIT3K4	77.7778
III27	77.4713
PU	76.8817
T1BM2	75.4923
3Bh 2 (34)	75.2688
M2 10A1 (A)	74.9598
4B4 C	74.4444
A4	74.4444
C6CetriA12 (92C)	74.4401
45a	73.8647
B-21a1	73.5484
KA25	73.3897
3Bh15 (47) (B)	73.3333
C12PCB22(A)	73.1422
IIBT2-4 (35)	73.1183
IIKA2-32 (43) (A)	73.0651
4b7	72.9167
IIPDA2-B 20 (A)	72.9119
C2-1 1aC1	72.5177
O14	72.3016
121 (A)	72.2222
5Bh-1	71.6667
4B4 (4) B	71.1162
C22 4-5-00 (B)	71.1111
01	71.0514
A16	70.8642
C10PCA43 (B)	70.7168
KA12 (B)	70.7146
1B4	70.5559
IIA3PH2	70.3584
IIPKA4-1b (36) (B)	70.1149
22a	70.0000
IIIT2B2a (45)	69.6655
B210A2	69.2491

IKA1-4 A	69.0139
B-1 0.1b	68.8889
II28	68.5441
I17	68.1362
IIT3K3	68.1238
IIPBTT5-2 (23)	67.7778
A20	67.7778
46 A	67.5952
3bh-13	67.5000
6K11	67.2439
3bh10	67.0363
A2	67.0251
I18	66.8515
B3	66.6667
B22	66.6667
IA3K2 (A)	66.6667
B-2 10a-5	66.6667
C10	66.6260
IIba1-3	66.5152
C1-2 1bC8	66.3255
C1-2 1C	66.2283
B-10.1 a1	65.5937
III +4 B2b	65.5914
M-2 1aC4	65.2330
111	64.8990
Locac-2BHI	64.3952
18b	63.8889
L1TA2	63.3883
IIBT5-1 (3)	63.3333
B2	62.8352
A22	62.7778
IKA3-2a-1	62.2222
I2TA2	61.5079
T2X-2	60.7331
3Bh 16 (49)	60.3943
D13	60.0000
Son de BLOQUE 1	59.9993
IIBA5-1	58.8889
E6	58.8889
IIbt1-1	58.5826
D7	58.5441
2k6	58.5176
4B3	58.5042

C5 PC D5	58.4290
3BH10	58.3333
N27	58.3333
IIT1P2	57.8585
IKA2-3a	57.6364
F20	57.4779
43	57.4713
9027	57.3696
B17	57.2043
24	57.0072
46 B	56.7778
N89	55.8154
D14	55.5556
B19	55.5556
D10	55.5556
6a (A)	55.0366
(52) IB4	53.8889
T2x-2	53.6030
B-11C-C1	53.3737
B7	53.3333
226	53.3333
A11	53.3333
3BH10 (A)	53.0983
IKA4-2 (B)	52.7692
L2TA2 (A)	52.6154
4B7(7)	52.5182
A3	52.2222
C15	51.1111
IIKT5-1b	50.5747
C18	50.5400
(38) IIBA1-3	50.0000
586	50.0000